

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-510440

(P2001-510440A)

(43) 公表日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テラコード ⁸ (参考)
C 0 7 K 7/04	Z N A	C 0 7 K 7/04	Z N A
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願平9-533700
 (86) (22) 出願日 平成9年3月20日 (1997.3.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年9月21日 (1998.9.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US 97/04493
 (87) 国際公開番号 WO 97/34921
 (87) 国際公開日 平成9年9月25日 (1997.9.25)
 (31) 優先権主張番号 60/013, 775
 (32) 優先日 平成8年3月20日 (1996.3.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, MX, US

(71) 出願人 スローン・ケタリング・インスティテュート・フォー・キャンサー・リサーチ
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10021、
 ニューヨーク、ヨーク・アベニュー 1275
 (72) 発明者 リビングストン、フィリップ・オー
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10021、
 ニューヨーク、イースト・セプティエナ
 インズ・ストリート 156、アパートメン
 ト 6シー
 (74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムチン接合体ペプチドワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ムチンを認識する免疫応答を生じることが出来るワクチンであって、対象において免疫応答を刺激または向上するのに有効な量の、免疫原性タンパクに結合したムチンペプチドと、有効量のアジュバントと、薬学的に許容可能な担体とを含有するワクチンを提供する。本発明は更に、ムチンを認識する免疫応答の生成を刺激または向上する方法であって、対象に対して、上記のワクチンを投与することを具備した方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. ムチンを認識するような免疫応答を生じさせ得るワクチンであって、対象における免疫応答を刺激または向上させるのに有効な量の、免疫原性タンパクに結合したムチンペプチドと、有効量のアジュバントと、薬学的に許容可能な担体とを含有するワクチン。

2. 請求項1に記載のワクチンであって、前記対象はヒトであるワクチン。

3. 請求項1に記載のワクチンであって、前記免疫原性タンパクはキーホールリンペットヘモシアニン、またはキーホールリンペットヘモシアニンの誘導体であるワクチン。

4. 請求項1に記載のワクチンであって、前記前記ムチンはMUC1であるワクチン。

5. 請求項1に記載のワクチンであって、前記ムチンがMUC2、MUC3、MUC4及びMUC5からなる群から選択されるワクチン。

6. 請求項4に記載のワクチンであって、前記ムチンペプチドの長さは10アミノ酸～300アミノ酸の範囲であるワクチン。

7. 請求項4に記載のワクチンであって、前記ムチンペプチドが、

APDTRPAPGSTAPPARGVTS、

TAPPARGVTSAPDTRPAPGS、

APDTRPAPGSTAPPARGVTSAPDTRPAPGS、

VTSAPDTRPAPGSTAPPARGVTSAPDTRPA、

(VTSAPDTRPAPGSTAPPARG)₂VTSAPDTRPA、

からなる群から選択されるワクチン。

8. 請求項7に記載のワクチンであって、前記ムチンペプチドは、VTSAPDTRPAPGSTAPPARGVTSAPDTRPAであるワクチン。

9. 請求項6に記載のワクチンであって、前記ムチン接合体の有効量は、約1μg～約1mgの量であるワクチン。

10. 請求項1に記載のワクチンであって、前記アジュバントがQS-21であるワクチン。

11. 請求項10に記載のワクチンであって、前記QS-21の有効量が約

10 μ g ~ 約20 μ g の量であるワクチン。

12. 請求項11に記載のワクチンであって、前記QS-21の有効量が約100 μ gであるワクチン。

13. 請求項1に記載のワクチンであって、前記対象は癌に冒されており、また当該ワクチンを投与したときに前記対象に生じる前記免疫応答は、癌を効果的に治療するものであるワクチン。

14. 請求項1に記載のワクチンであって、前記対象は癌に罹り易く、また当該ワクチンを投与したときに前記対象に生じる前記免疫応答は、癌を有効に予防するものであるワクチン。

15. 請求項14に記載のワクチンであって、前記癌の細胞はその表面にムチンを有するものであるワクチン。

16. 請求項14に記載のワクチンであって、前記癌は乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺ガンまたは脾臓癌であるワクチン。

17. 対象においてムチンを認識する免疫応答の生成を刺激または向上させる方法であって、前記対象に対して、有効投与量の請求項1のワクチンを投与することを具備した方法。

18. 癌に冒された対象において癌を治療する方法であって、前記対象に対して、有効投与量の請求項1のワクチンを投与することを具備した方法。

19. 癌に罹り易い対象において癌を予防する方法であって、前記対象に対して、有効投与量の請求項1のワクチンを投与することを具備した方法。

20. 癌に罹り易い対象において癌の再発を防止する方法であって、前記対象に対して、有効投与量の請求項1のワクチンを投与することを具備した方法。

21. 請求項17、18、19または20に記載の方法であって、前記免疫原性タンパクはキーホールリンベットヘモシアニンまたはキーホールリンベットヘモシアニンの誘導体である方法。

22. 請求項17、18、19または20に記載の方法であって、前記アダプタントはQS-21である方法。

23. 請求項17、18、19または20に記載の方法であって、前記ム

チンはMUC1である方法。

24. 請求項17, 18, 19または20に記載の方法であって、前記ムチンは、MUC2、MUC3、MUC4およびMUC5からなる群から選択される方法。

25. 請求項23に記載の方法であって、前記ムチンペプチドの長さは10アミノ酸～300アミノ酸の範囲である方法。

26. 請求項25に記載の方法であって、前記ムチンペプチドは、

APDTRPAPGSTAPPAGVTS、

TAPPAHGVTAPDTRPAPGS、

APDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPAPGS、

VTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPA、および

(VTSAPDTRPAPGSTAPPAG)₂VTSAPDTRPA、

からなる群から選択される方法。

27. 請求項26に記載の方法であって、前記ムチンペプチドは、VTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPAである方法。

28. 請求項23に記載の方法であって、前記ムチン接合体ペプチドの有効量は約1 μ g～約1mgの量である方法。

29. 請求項25に記載の方法であって、前記アジュバントはQS-21である方法。

30. 請求項29に記載の方法であって、前記QS-21の有効量は約10 μ g～約200 μ gである方法。

31. 請求項30に記載の方法であって、前記QS-21の有効量は約100 μ gである方法。

32. 請求項18, 19または20に記載の方法であって、前記癌の細胞はその表面にムチンを有するものである方法。

33. 請求項18, 19または20に記載の方法であって、前記癌は乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺ガンまたは肝癌である方法。

【発明の詳細な説明】

ムチン接合体ペプチドワクチン

ここに開示する発明は、厚生省から属与されたN I H、補助金CA61422号による政府の支援の下でなされたものである。従って、アメリカ合衆国政府は本発明における一定の権利を有する。

【発明の背景】

この出願の全体を通して、括弧内に種々の参考文献が引用されている。これら刊行物の開示は、本発明が属する技術の状態をより完全に記述するために、その全体が、本発明の一部をなす参照として本願に組み込まれる。これら参考文献の完全な書誌的引用は、請求の範囲の前の明細書末尾に記載してある。

ムチンMUC1のようなムチン類は、上皮起源の多くのヒト癌で多量に発現する、広範にグリコシル化された高分子量 (>200kD) のタンパクである(1-5)。最近の研究によって、MUC1は分子の細胞外部分に20アミノ酸ペプチド(PDTRPAGSTAPFAGVTSA) (配列番号7) の可変数のタンデムリピートを含むこと、並びに抗ムチン α Ab類および細胞障害性T細胞により認識される殆どの抗原性エпитープは、該リピート内のAPDTR切片であることが示されている(6-8)。正常組織におけるMUC1の発現は、主に分泌性細胞の頂部表面、即ち免疫系に対するアクセスが最小限の部位に限定される(1, 4)。加えて、正常組織に発現したMUC1の広範なグリコシル化によって、ペプチド骨格に対する免疫系の暴露は更に制限される。癌腫では、ムチンのペプチド骨格は完全にはグリコシル化されないで、正常には露出されないペプチド配列が免疫系に露出されることになる(6)。結局、MUC1ペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、正常なムチンおよび癌腫ムチンの両者におけるアミノ酸配列は同じであるにもかかわらず、乳房、肺臓および卵巣起源の癌に由来する癌腫関連ムチンに対して特異性を示す(9)。MUC1を発現するワクシニア組換え体でラットを免疫感作すると、

MUC1を発現する腫瘍細胞による攻撃からの防御をもたらす(5)。これらの発見は、MUC1に対する免疫感作が可能であること、および該免疫感作は、乳房または肺臓癌の患者における腫瘍の再増殖を防止し得ることを示唆している。この研究に

において、出願人は、長さおよび配列が異なるMUC1ペプチドを合成すると共に、種々のアジュバントと混合したこれらペプチドを含有するワクチン、または異なったリンカーを用いてタンパクキャリアであるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合されたこれらペプチドを含有するワクチンを調製した。臨床試験のための準備において、異なったワクチンの液性免疫応答および細胞性免疫応答に対するインパクト、および腫瘍攻撃からの防御性をマウスで比較した。

ヒトムチンMUC1は、幾つかの上皮起源の癌において多量に発現されており、その殆どは正常組織における分泌性細胞の頂部表面に限定されている。従って、これは癌の免疫療法における潜在的な目標である。臨床試験の準備において、種々のアジュバントと混合し、または種々のリンカー法を用いてタンパクキャリアであるキーホールリンペットヘモシアニンに結合した長さおよび配列の異なる合成MUC1ペプチドを含有するワクチンを、マウスにおいて研究した。MUC1ペプチド(30アミノ酸を含有する) + アジュバントQS-21またはBCGは、抗体を誘導することができなかった。しかし、KLHに結合されたMUC1ペプチド(MUC1-KLH) + QS-21は、免疫感作ペプチドおよびMUC1発現腫瘍細胞に対する高力化の抗体を誘導した。遅延型過敏性、リンパ球増殖および細胞障害性Tリンパ球を含むT細胞応答は、これらワクチンの何れで免疫感作したマウスにも観察されなかったが、MUC1-KLHで免疫感作されたマウスにおいては、MUC1発現腫瘍細胞からの顕著な防御が観察された。これらの研究に基づいて、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスク心イミドエステルリンカーを用いて調製したMUC1-KLH接合体-QS-21を含有するワクチンを調製した。

[発明の概要]

本発明は、ムチンを認識する免疫応答を生じさせるワクチンであって、

対象における免疫応答を刺激または向上させるのに有効な量の、免疫原性タンパクに結合したムチンペプチドと、有効量のアジュバントと、薬学的に許容可能な担体とを含有するワクチンを提供する。

一つの態様において、前記対象はヒトである。

もう一つの態様において、前記免疫原性タンパクはキーホールリンペットヘモ

シアニン、またはキーホールリンペットヘモシアニンの誘導体である。

別の態様において、前記ムチンはMUC1である。前記ムチンは、MUC2-5のような他のムチンを含んでいてもよい。

当業者は、本発明を他のムチンに適用することができるであろう。

更なる態様において、MUC1ペプチドの長さは10アミノ酸～300アミノ酸の範囲である。

一つの態様において、MUC1接合体の有効量は、約1 μ g～約1mgの量である。もう一つの態様において、前記アジュバントはQS-21である。

一つの態様において、QS-21の有効量は、約10 μ g～約200 μ gの量である。別の態様において、QS-21の有効量は約100 μ gである。

もう一つの態様において、前記対象は癌に冒されており、また該対象において生じる前記免疫応答は癌を効果的に治療する。更なる態様において、前記対象は癌に罹り易く、また当該ワクチンを投与したときに、該対象に生じる免疫応答は癌を有効に予防する。一態様において、前記癌の細胞はその表面にムチンを有する。

更なる態様において、前記癌は乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺ガンまたは膀胱癌である。本発明は、上皮起源の他の癌にも適用可能である。

本発明はまた、ムチンを認識する免疫応答を生じる方法であって、対象に対して、有効量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提供する。

本発明は、癌に冒された対象において癌を治療する方法であって、前記対象に対して、有効量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提議する。

本発明は、癌に罹り易い対象における癌を予防する方法であって、前記対象に対して、有効量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提供す

る。

上記の方法において、前記免疫原性タンパクはキーホールリンペットヘモシアニンまたはキーホールリンペットヘモシアニンの誘導体であり得る。上記方法の一態様において、前記アジュバントはQS-21である。

[図面の簡単な説明]

図1は、MUC1のKLHへの結合を示す図である。

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、ムチンを認識するような免疫応答を生じさせ得るワクチンであって、対象における免疫応答を刺激または向上させるのに有効な量の、免疫原性タンパクに結合したムチンペプチドと、有効量のアジュバントと、薬学的に許容可能な担体とを含有するワクチンを提供する。一つの態様において、前記対象はヒトである。

有効量のムチン接合体ペプチドは、単純な滴定実験によって容易に決定することができる。動物を具なった量の接合体ペプチドで免疫感作し、生じた免疫応答で試験すればよい。上記の有効量は、適切な免疫応答を生じるであろう。

もう一つの態様において、前記免疫原性タンパクはキーホールリンペットヘモシアニン、またはキーホールリンペットヘモシアニンの誘導体である。他の適切な免疫原性タンパクもまた、本発明において使用することができる。当業者は、免疫応答を誘起できることが知られたムチンペプチドに、試験すべき免疫原性タンパクを結合することによって、免疫原性タンパクの適切さを試験することができる。結合されたムチンペプチドを動物に投与して、該ペプチドが良好な免疫応答を生じることができるかどうかを試験すればよい。良好な免疫応答をもったタンパクは、適切な免疫原性タンパクである。

別の態様において、前記ムチンはMUC1である。該ムチンは、MUC2-5のような他のムチンを含んでいてもよい。当業者は、本発明を他のムチン類にも適用することができるであろう。

更なる態様において、MUC1ペプチドの長さは10アミノ酸～300アミノ酸の範囲である。特別の態様において、該ムチンペプチドは、

APDTRFAPGSTAPPARGVTS、
TAPPARGVTSAPDTRPAPGS、
APDTRFAPGSTAPPARGVTSAPDTRPAPGS、
VTSAPDTRPAPGSTAPPARGVTSAPDTRPA、
(VTSAPDTRPAPGSTAPPARG)₂VTSAPDTRPA、

からなる群から選択される。更に特別な態様において、前記ムチンペプチドは、VTSAPDTRPAPGSTAPPABGVTSAPDTRPAである。

一つの好ましい態様において、MUC1接合体の有効量は、約 $1\mu\text{g}$ ～約 1mg の量である。

もう一つの態様において、アジュバントはQS-21である。当業者には容易に理解されるように、他の適切なアジュバントを同様に使用してもよい。

一つの好ましい態様において、QS-21の有効量は、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $200\mu\text{g}$ の量である。別の態様において、QS-21の有効量は約 $100\mu\text{g}$ である。更に好ましい別の態様において、QS-21の有効量は約 $100\mu\text{g}$ である。

もう一つの態様において、前記対象は癌に冒されており、また該対象において生じる前記免疫応答は癌を効果的に治療する。

更なる態様において、前記対象は癌に罹り易く、また当該ワクチンの投与に際し、該対象に生じる免疫応答は癌を有効に予防する。一態様において、前記癌の細胞はその表面にムチンを有する。

更なる態様において、前記癌は乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺ガンまたは膵臓癌である。本発明は、上皮起源の他の癌にも適用可能である。

本発明はまた、対象において、ムチンを認識する免疫応答の生成を刺激または向上させる方法であって、前記対象に対して、有効投与量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提供する。

本発明は、癌に冒された対象において癌を治療する方法であって、前記対象に対して、有効投与量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提供する。

本発明は、癌に罹り易い対象における癌を予防する方法であって、前記対象に対して、有効量の上記ワクチンを投与することを具備した方法を提供する。

上記の方法において、前記免疫原性タンパクにはキーホールリンペットヘモシアニンまたはキーホールリンペットヘモシアニンの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

上記方法の一態様において、前記アジュバントはQS-21である。

別の態様において、前記ムチンはMUC1である。該ムチンは、MUC2-5のような他

のムチン類を含んでいてもよい。当業者は、本発明を他のムチン類にも適用できるであろう。

このムチンは、MUC2-5のような他のムチン類を含むことができる。当業者は、他のムチン類において本発明を適用できるであろう。

更なる態様において、MUC1ペプチドの長さは30アミノ酸～300アミノ酸の範囲である。特別の態様において、該ムチンペプチドは、

APDTRPAGSTAPPAGVTS、
TAPPAGVTSAPDTRPAGS、
APDTRPAGSTAPPAGVTSAPDTRPAGS、
VTSAPDTRPAGSTAPPAGVTSAPDTRPA、
(VTSAPDTRPAGSTAPPAG)₂VTSAPDTRPA、

からなる群から選択される。更に特別な態様において、前記ムチンペプチドは、VTSAPDTRPAGSTAPPAGVTSAPDTRPAである。

一つの好ましい態様において、MUC1接合体の有効量は、約1 μ g～約1mgの量である。

もう一つの態様において、アジュバントはQS-21である。当業者には容易に理解されるように、他の適切なアジュバントを同様に使用してもよい。

好ましい態様において、MUC1接合体ペプチドの有効量は、約1 μ g～約1mgの量である。

もう一つの態様において、アジュバントはQS-21である。当業者であれば容易に理解できるように、他の適切なアジュバントを同様に使用してもよ

い。

好ましい態様において、QS-21の有効量は約10 μ g～約200 μ gである。更に好ましい別の態様において、QS-21の有効量は約100 μ gである。

一つの態様において、前記癌細胞はその表面にムチンを有する。

更なる態様において、前記癌は乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺ガンまたは膵臓癌である。本発明は他の上皮起源の癌にも適用可能である。

本発明は、以下の実験の詳細の記載によって、より良く理解されるであろう。

しかし、当業者は、ここで述べる具体的な方法および結果が、後述の請求の範囲で更に完全に記載される発明の単なる例示に過ぎないことを容易に承認するであろう。

〔実験の詳細〕

第一実験シリーズ

＜材料および方法＞

材料、ペプチド： 配列の異なる20アミノ酸、30アミノ酸および50アミノ酸を含むMUC1ペプチドを、スローン・ケッタリング記念癌センターの中核施設において、アブライドバイオシステムズ社のモデル431A自動ペプチド合成器を用いて合成了。該合成ペプチドのC又はN末端のオリジナル配列に、表示されたようにシステンを付加し、蛋白担体との接合を容易にした(表1)。

表1 ワクチン調整及びテスト用に使用された

合成MUC1ペプチドの配列

ペプチド	アミノ酸配列
MUC1 (20A)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTSC (C) (配列番号 2)
MUC1 (20)	TAPPAHGVTSA PDTRPAPGS (C) (配列番号 3)
MUC1 (30A)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGS (C) (配列番号 4)
MUC1 (30)	(C) VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPA (配列番号 5)
MUC1 (50)	(C) (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG) ₂ VTSAPDTRPA (配列番号 6)

マウス及び細胞系： IMFG-2は、MUC1反応性マウスIgG mAbである(10)。410.4は、ネズミ(BALB/c)乳腺上皮癌細胞系(11)であり、E4は、MUC1遺伝子(12)によってトランスフェクトされた410.4細胞のクローンから誘導された。IMFG-2、410.4及びE4は、ジョイス・テイラー・パラディミトリウ (Joyce Taylor-Papadimitriou) (帝国癌研究財団、ロンドン、英国)の好意によって提供された。MCF7は、ヒト乳癌細胞系(13)である。

動物及びアジュバント： 雄BALB/c×C57 BL/6 F1マウス、BALB/c×C3H F1

マウス、又はBALB/cマウス、6週齢は、ジャクソン研究所 (Bar Harbor, Maine) から入手した。アジュバントQS21、つまり精製されたサポニン分画(16)は、ケンブリッジ・バイオテックInc. (Worcester, MA)から入手した。Bacille Calmette-Guerin (BCG) は、コノート (connaught) 研究所 (Ontario, Canada) から購入した。

MUC1ペプチドとキーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) との接合: KLH (PerImmune Inc., Rockville, MD) を、MUC1ペプチド接合体の担体蛋白として使用した。m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサ

クシミド・エステル (MBS, Pierce Co., Rockford IL)、N-サクシンイミジル、3-(2-ピリдилジチオ)プロピオネート (SPDP, Pierce Co., Rockford, IL) 及びグルタルアルデヒド (アルドリッチ化学株式会社, Milwaukee, WI) を、MUC1ペプチド接合体を作成するためのリンカーとして使用した(図1)。

MBS接合法(14): 70 μ l のジメチルフォルムアミド (シグマ化学株式会社、セントルイス、モンタナ) 中 1 g のMBSを、0.01Mのりん酸緩衝液 (PB) pH7.0中5mgのKLHに添加した。一時間後、MBS/KLH溶液を0.1M PB pH6.0で平衡化されたセファデックスG-15カラムに加えた。OD280 (MBS-KLH) の最初のピークを採取し、5mgのMUC1ペプチドと混合し、室温で2時間攪拌した。未接合ペプチドを、セントリプレップ (centriprep) -30濃縮器 (Amicon Inc., Beverly, MA) を使用してMUC1-KLH接合体から分離した。MUC1/KLH接合比 (500/1-600/1) は、スペクトロホトメータによる、ペプチド及びKLHの初期量ならびに濾過物中の未接合ペプチドの測定量に基づいて計算した。

SPDP接合法(15): SPDP法による接合は、MBSがSPDPによって置き換えられた以外は、MBS方法による接合同様であった。SPDP法から得られるMUC1/KLHの接合比は、二つの異なる分析: 即ち、1) 未接合ペプチドの量を基にした方法、2) 接合反応によって産生されたSPDP副産物 (ピリジン-2-チオニン) を基にした方法によって計算された。両分析によるMUC1/KLH比は、400/1-500/1であった。

グルタルアルデヒド接合法(14): 1mlのほう酸緩衝液pH10中の5mgKLHを、5mgのMUC1ペプチドと混合した。0.3%のグルタルアルデヒド1mlを加え、室温で2

時間攪拌した。未反応グルタルアルデヒドを0.25mlの1Mグリシンを添加して30分間でブロックした。MUC1-KLH溶液をPBSで一晩透析した。グルタルアルデヒドはOD215で未接合ペプチドの吸収を阻害するので、MUC1/KLH比は、初期比(500/1)に基づいて推定した。

ワクチンの調整と投与： マウスを、8-15 μ g MUC1-ペプチド単独あるいはKLH-8-10 μ gのQS-21又は5x10⁵ BCGと接合させた8-15 μ g MUC1-ペプチドで、1週間の間隔をおいて2-3回免疫感作した。第二回又は三回目の免疫感作後8-10日して、マウスを出血させ、血清をELISA及びフロー・サイトメトリー分析による試験用に分離した。

血清分析：ELISA： ELISAを前述したように実行した(17)。0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)中入れたMUC1-ペプチドを、ELISAプレートに0.1 μ g/ウエルで塗布した。抗血清連続希釈物を、塗布ペプチドと共に1時間インキュベートした。二次抗体は、希釈率1/200のアルカリりん酸ホスファターゼ結合接合ヤギ抗マウスIgGまたはIgMであった(southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingam, AL)。ELISAの力価は、正常マウス血清の吸光度を0.1以上高い吸光度を生じる最大希釈として定義される。各分析では、陽性対照としてMab BMFG-2が使用された。

フロー・サイトメトリー： 腫瘍細胞(2 x 10⁵)を、1/30に希釈された抗血清又は1/2に希釈されたmAb上清液40 lと共に、30分氷上でインキュベートした。3%子牛胎児血清/りん酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、該細胞を1/15に希釈された蛍光イソチオシアネートを用いて標識した、ヤギ抗マウスIgM又はIgG (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) 20 μ lと共にインキュベートした。染色された細胞の陽性集団を、フローサイトメトリー(EFICSプロフィルII, Coulter Co, Hialeah, FL)で前述したように定量した(18)。

リンパ球分析： 増殖分析(19)：第二回目の免疫感作後7日目のマウスの脾臓からリンパ球(2x10⁵/ウエル)を調整し、これをMUC1-ペプチド(0.1-10 μ g/ml)又はKLH(1-20 μ g/ml)と共に、37℃、5% CO₂の条件下で3-5日インキュベートした。0.5 μ Ci ³Hチミジン(ICN, Irvine, CA)/ウエルを添加し、その

後18時間後に細胞を処理して、1204

βプレート (wallac Oy, Finland) で分析した。

遅延型過敏性(DTH) (20) : 第二回目の免疫感作後2週間目に、 $5 \mu\text{g}$ のMUC1-ペプチド又はKLHを $20 \mu\text{l}$ PBS中で後足パッド(hind footpad)に注入した。足パッドの厚さを24時間及び48時間後に測定した。

細胞障害性Tリンパ球(CTL)分析(21) : 第二回目の免疫感作後7日目に、脾臓のリンパ球を、 $1-8 \mu\text{g}/\text{ml}$ MUC1-ペプチドと 10^6 単位/ ml IL-2 (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて7-10日間、インビトロで感作した。被感作リンパ球は、次に、ユーロビウムで標識したE4細胞又は410.4細胞と共に、10:1-100:1の比率で、4時間インキュベートした。目的細胞から分泌されるユーロビウムの分泌パーセントを、時間分解1232デルフィア・フルオロメータ (wallac Oy, Finland) (18) で測定した。

マウスにおける腫瘍誘発試験 : 第二回目の免疫感作後3日目に、マウスに 2×10^5 のE4細胞を皮下注射した。25日後にマウスを殺生し、肺を10%ホルムアルデヒドで固定し、前述したように肺における腫瘍コロニーの数を計測した(22)。

<実験結果>

MUC1-KLHワクチン構築物の血清学的反応における影響、MUC1-ペプチド及びMUC1の接合物の比較(表2) : 3回のワクチン接種後、 $15 \mu\text{g}$ ペプチドMUC1 (30) + $10 \mu\text{g}$ QS-21、又は + 5×10^5 BCG/ワクチンで免疫感作された6マウスから得られた血清では、MUC1に対するIgM又はIgG抗体の有意な力価は示されなかったが、一方、KLH- $10 \mu\text{g}$ QS-21に接合された $15 \mu\text{g}$ MUC1 (30) で免疫感作されたマウスからの血清は、高いIgGの力価及び中程度のIgM (平均力価は夫々、 $1:409600$ 及び $1:800$) を示した。未接合のMUC1で免疫感作されたマウスではなく、MUC1 (30) -KLHで免疫感作されたマウスから得られた血清はまた、MUC1を発現するE4マウス乳癌細胞及びMCF7とヒト乳癌細胞と強い反応性を示した。

表2 MUC1-ペプチド又はMUC1-KLHの接合体で免疫感作

されたマウスから得られる抗血清との血清学的反応

抗血清	免疫性MUC1ペプチド に対するELISA力価		フローサイトメトリー (IgG) 陽性細胞 (%)	
	IgM	IgG	E4 細胞	MCF7 細胞
<u>対照群</u>				
非感作マウス 1	ブランク ^d	ブランク	4	5
非感作マウス 2	ブランク	ブランク	2	4
抗-GD3-KLH 1	< 1:20	< 1:25	2	5
抗-GD3-KLH 2	< 1:20	< 1:25	4	7
mAb HMFG-2	-	1:320	94	57
<u>Muc1(30) + BCG</u>				
G2-1	< 1:20	< 1:25	3	-
G2-2	< 1:20	< 1:25	2	-
G2-3	< 1:20	< 1:25	4	-
G2-4	< 1:20	< 1:25	3	-
G2-5	< 1:20	< 1:25	1	-
G2-6	< 1:20	< 1:25	1	-
平 均	< 1:20	< 1:25	3	4 ^b
<u>Muc1(30) + QS21</u>				
G3-1	< 1:20	< 1:25	1	-

G3-2	< 1:20	< 1:25	1	-
G3-3	< 1:20	< 1:25	1	-
G3-4	< 1:20	< 1:25	1	-
G3-5	< 1:20	< 1:25	1	-
G3-6	< 1:20	< 1:25	1	-
<u>平 均</u>	<u>< 1:20</u>	<u>< 1:25</u>	<u>1</u>	<u>3^b</u>

Muc1 (30)-KLH +

<u>QS21</u>				
G5-1	1:400	1:819200	93	69
G5-2	1:800	1:204800	66	25
G5-3	1:800	1:819200	86	56
G5-4	1:1600	1:819200	97	79
G5-5	1:800	1:204800	72	40
G5-6	1:3200	1:204800	94	67
<u>平 均</u>	<u>1:800</u>	<u>1:409600</u>	<u>90</u>	<u>62</u>

Muc1 (30A)-KLH +

<u>QS21</u>				
G4-1	1:800	1:409600	83	83
G4-2	1:800	1:819200	92	58
G4-3	1:800	1:204800	95	45
G4-4	1:400	1:204800	81	20
G4-5	1:1600	1:819200	93	57
G4-6	1:400	1:204800	85	48
<u>平 均</u>	<u>1:800</u>	<u>1:307200</u>	<u>89</u>	<u>53</u>

Muc1 (50)-KLH +

<u>QS21</u>				
G6-1	1:3200	1:204800	73	40
G6-2	1:3200	1:204800	89	52
G6-3	1:3200	1:409600	98	79
G6-4	1:3200	1:409600	86	57
G6-5	1:1600	1:409600	97	72
G6-6	1:3200	1:409600	83	53
<u>平 均</u>	<u>1:3200^c</u>	<u>1:409600</u>	<u>88</u>	<u>55</u>

^a 本表中のMUC1接合体は全て、MBS法によって作成された。15gMUC1-KLH/マウス、又はMUC1-ペプチド15g/マウス+QS-21 10g/マウスがあるいは+BCG3 $\times 10^5$ /マウス、で免疫感作されたマウスは、三回目のワクチン処置後7日目に出血させた。

。

^b 本グループ全6匹のマウスから得られた貯蔵血清より得られたテスト値

^c MUC1 (30A) -KLH及びMUC1 (30) -KLHグループとのMann-Whitney/Wilcoxon非パラメトリック統計による比較、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$

^d 末活性のマウスから得られた血清の吸光度値は、減算用バックグラウンド値として使用された。

接合方法の比較 (表3) : グルタルアルデヒドを使用して接合されたMUC1(20)-KLH、並びにSPDPを使用して接合されたMUC1(20)-KLHおよびMUC1(30A)-KLHで免疫感作されたマウスから得られたIgGの平均力価は、夫々1:1350、1:50、1:2700であった。MBSを使用して接合されたMUC1(20)-KLH、MUC1(30A)-KLHで免疫感作した後の平均IgG力価は、夫々1:12150及び1:12150であり、グルタルアルデヒドまたはSPDP ($p < 0.01$) を使用して調整されたものよりも著しく高かった。同様に、MUC1(20)-KLH(グルタルアルデヒド)、MUC1(20)-KLH(SPDP)、MUC1(30A)-KLH(SPDP)で免疫感作されたマウスから得られた血清についてのフローサイトメトリーによる平均陽性細胞%は、夫々59%、32%、61%であった。MUC1(20)-KLH(MBS)群及びMUC1(30A)-KLH(MBS)群の両者は、97%の陽性細胞を有していた。これは、グルタルアルデヒド又はSPDP ($p < 0.05$) によって調整された接合体よりも著しく高かった。一方、MUC1(20A)接合体については、力価又は陽性細胞%において、MBS及びSPDP法の間に明瞭な差異は見られなかった。MUC1陰性細胞系410.4に対する反応性は、全グループで最低であった。

長さの異なるMUC1ペプチド (表3) の比較 : 免疫ペプチドに対する平均IgG力価は、MUC1(20A)-KLH(1:4500(SPDP)及び1:4500(MBS))、並びにMUC1(30A)-KLH(1:2700(SPDP)及び1:12150(MBS))で免疫感作されたマウスから得られた血清については同等であった。MUC1(30A)-KLH(SPDP)(61%)についての陽性細胞の平均%は、MUC1(20A)-KLH(SPDP)(32%)についてよりも若干高くても著しく高くはないが、MUC1(30A)-KLH(MBS)(97%)についての平均陽性細胞%は、MUC1(20A)-KLH(MBS)(54%)よりも著しく高かった。MUC1(50)-KLHをMUC1(30)-KLH及びMUC1(20A)-KLH(表2及び3)と比較すると、陽性細胞%については顕著な違いは見られなかった。

表3 別種の方法によってKLHに接合されたMUC1で免疫感作されたマウスから得られた抗血清の血清学的反応

	ELISA ペプチド (IgG)	フローサイトメトリー (IgG)	
		410.4 細胞	E4 細胞
混合した正常な mAb HMFG II グルタルアルデヒド	ブランク	4	2
MUC1 (20) - KLH	1:320	1	99
1	4050	4	77
2	1350	14	53
3	1350	9	59
平均	1350	2	59
SPDP 法			
MUC1 (20A) - KLH			
1	4050	4	4
2	4050	14	32
3	4050	10	91
平均	4050	10	32
MUC1 (20) - KLH			
1	1350	5	96
2	50	27	43
3	50	7	16
4	50	2	55
5	150	3	2
6	50	11	21
平均	50	6	32
MUC1 (30A) - KLH			
1	4050	11	85
2	4050	10	96
3	4050	4	56
4	150	11	44
5	450	2	30
6	1350	3	65
平均	2700	7	61
MBS 法			
MUC (20A) - KLH			
1	4050	11	61
2	4050	6	54
3	12150	8	54
平均	4050	8	54
MUC1 (20) - KLH			
1	12150	6	89
2	12150	14	99
3	12150	8	95
4	36450	6	99
5	109350	5	99
6	12150	10	92
平均	12150 ^a	7	97 ^b
MUC1 (30A) - KLH			
1	12150	8	95
2	12150	6	99
3	12150	12	86
4	12150	3	98
5	12150	9	60
6	36450	7	99
平均	12150 ^a	7	97

^a 10g MUC1-KLH/マウス+Q521 10g/マウスによる第三回目の免疫感作後、10日

目。各グループのマウス1-3番目は、CB6F1株であり、4-6番目は、BA

LB/cであった。

^b SPDP又はグルタルアルデヒド法によって夫々接合されたMUC1-KLHのMann-Whitney/Wilcoxon非パラメトリック統計を使用した比較。ELISA力価については $p < 0.01$ 、陽性細胞%については $p < 0.05$ 。

異なる配列を持つ接合されたMUC1に対する血清学的反応(表3)：

MUC1-KLH(SPDP) (1:50) で免疫感作されたマウスから得られる血清の免疫ペプチドに対する平均IgG力価は、MUC1 (20A)-KLH (SPDP) (1:4050) で免疫感作されたマウスから得られるものよりも明らかに低かった。しかしながら、これら二つのグループから得られる血清についてのフローサイトメトリーによる平均陽性細胞%は同じであった(32%)。MUC1 (20)-KLH(MBS)で免疫感作したマウスから得られた平均IgG力価(1:12150)、及び陽性細胞% (97%) は何れも、MUC1 (20A)-KLH (MBS) によって免疫感作されたマウスについてのもの (夫々、1:4050及び54%、 $p < 0.05$) よりも著しく高かった。MUC1 (30)-KLHをMUC1 (30A)-KLH (表2) と比較しても、血清学的反応において顕著な差異は見られなかった。

MUC1免疫処理のT細胞反応における影響： 表3及び表4における全マウスをDTHについてテストした。5 μ g MUC1-ペプチドを足パッド注入後48時間目に、MUC1-ペプチド及びMUC1-KLH構築物で免疫感作したマウスの平均足パッド厚さは、夫々 1.72 ± 0.05 mm ($n=12$) 及び 1.73 ± 0.06 mm ($n=28$) であり、PBSのみを注入したマウスの 1.73 ± 0.06 mm ($n=20$) と相違してはいなかった。しかしながら、5g KLH (陽性コントロール) によるDTHテストの後、MUC1-KLHで免疫されたマウスの平均足パッドの厚さは 2.1 ± 0.17 mm ($n=8$) であり、初回免疫しなかったマウス及びMUC1-ペプチドで免疫感作されたマウスのKLH DTH反応 (夫々、 1.71 ± 0.02 mm ($n=8$) 及び 1.71 ± 0.03 mm ($n=6$)) を上回って著しく増加した。

増殖分析の結果は、DTH分析の結果と同等であった。MUC1 (20)-KLH、MUC1 (30)-KLH、及びMUC1 (50)-KLH又は対応するペプチドで免疫感作された各グループについて5匹のマウスから得られた脾臓細胞は、これらの細胞をその対応するペプチドでインキュベートした時、初回免疫しなかったマウス (4530cpm) を凌ぐリンパ球の増加を示さなかった。増殖の増加 (14500-18600cpm) は、MUC1-KLH接合体で免疫感作したマウスから得られる脾臓細胞をKLHと共にインキュベート

した時にのみ観察された。

エフェクター細胞がマイトマイシン処理したE4細胞で免疫感作されたBALB/c x C3H F1マウスから得られたとき、E4細胞(E:T、60:1)についての3CTIL分析で平均30%の特異的分泌が観察された。しかしながら、MUC1-ペプチド又はMUC1-KLH接合体で免疫感作されたマウスからは何ら顕著な特異的分泌(0-2%)は見られなかった。

MUC1-KLHによる活性免疫感作の、BALB/c x C3HマウスでのE4細胞肺転移についての影響(表4)： MUC1(30)-KLHで免疫感作した10匹のマウスは、良好なE4細胞表面反応性(平均陽性細胞%：52%)をもったIgG抗体を、平均力価1:5940で産生した。E4細胞で皮下誘導後4週間目に、10匹のマウスから得られた肺の平均コロニー数は、PBS及びKLHのコントロール群について夫々19及び20であったが、MUC1(30A)-KLH群では僅に1であった($p < 0.01$)

表4 MUC1(30)-KLH+QS21による
活性免疫感作のE4細胞肺転移*における影響

血清または mAb	ELISA 相互力価	フローサイトメトリー 陽性細胞 % (IgG)		肺における コロニーの数
		(IgG)	E4 細胞	
mAb HMFG-2	320	1	81	
PBS 対照				
1-1	-	-	-	44
1-2	-	-	-	51
1-3	-	-	-	6
1-4	-	-	-	1
1-5	-	-	-	5

1-6	-	-	-	39
1-7	-	-	-	2
1-8	-	-	-	30
1-9	-	-	-	3
1-10	-	-	-	4
平均 ^a	ブランク	5	5	19
KLH 対照				
2-1	-	-	-	51
2-2	-	-	-	8
2-3	-	-	-	14
2-4	-	-	-	5
2-5	-	-	-	48
2-6	-	-	-	17
2-7	-	-	-	8
2-8	-	-	-	11
2-9	-	-	-	23
2-10	-	-	-	14
平均 ^a	0	5	5	20
MUC1 (30A) -				
KLH				
3-1	8100	5	50	4
3-2	8100	5	62	5
3-3	2700	6	21	3
3-4	2700	4	84	1
3-5	2700	5	26	0
3-6	2700	5	49	0
3-7	8100	6	35	0
3-8	8100	10	63	1
3-9	8100	5	84	0
3-10	8100	6	41	0
平均	5240	6	52	1 ^a

^a BALB/c x C3H F1を一週間間隔で二回、8 g MUC1 (30A) -KLH + 8 g QS-21/マウスで免疫感作し、8 g MUC1 (30A) ペプチド + 8 g QS-21で二回目にワクチン接種した後1週間目に追加免疫した。KLH群には、MUC1 (30A) -KLH群と同量のKLHが投与された。第二回目のワクチン処理後の3日目に、 2×10^5 のE 4細胞が全グループに対して皮下注射された。マウスを殺生し、肺における転移コロニーをチェックした。二回目のワクチン処理後10日目に、ELISA用、フローサイトメトリ用にマウスを出

血させた。

^b ELISA及びサイトメトリのテスト値は、本グループにおいて10匹のマウスか

ら得られた血清プールから得られた。

・ Mann-Whitney/Wilcoxon非パラメトリック統計によるPBS及びKLHコントロール群との比較、 $p<0.01$ 。

<実験の考察>

MUC1特異的な抗体は、偶発的乳癌、肺腺癌、及び肺癌患者（2、23）から得られた血清中で検出されてきた。これによって、MUC1がヒト免疫システムによって認識され得る事が示唆され、また、MUC1を発現する腫瘍細胞に対する免疫が、適切に構築されたMUC1ワクチンによって誘導されるかもしれないという可能性が惹起された。出願人は、種々のアジュバントと混合されるか、又はKLHに対して様々なリンカー法を使用して共有結合された、異なる長さで配列を持つ合成MUC1ペプチドを含むワクチンをここに開発した。MUC1ペプチド+QS21あるいは+BCGを含むワクチンは、抗体を誘導しなかった。しかしながら、MUC1ペプチドをKLH+QS-21に結合すると、高力価のIgM、特にMUC1抗原に対するIgG抗体が誘導された。これらの抗血清と、MUC1を発現するマウス腫瘍B4細胞及びヒト乳癌腫瘍MCF7細胞との反応性は、mAb BMEG-2に対するのと同様に強かった。MBS、SPDP及びグルタルアルデヒドを利用する接合法を比較すると、MBSは、MUC1-KLH接合体を調製する為の最良のリンカーであり、力価及び特異性の点で最も好ましい抗体を誘導する事がわかった。MUC1ペプチドの長さが免疫反応に与える影響についての結論は今回導けなかったけれども、30又は50アミノ酸MUC1接合体は、MUC1陽性腫瘍細胞に対する抗血清を、20アミノ酸MUC1接合体よりもより高力価で誘導するようだ。単一の縦列（tandem）繰返し（20アミノ酸）を持つMUC1ペプチドについて、ペプチド内APDTR、即ちMUC1（20）は、該ペプチドのN末端にAPDTRを含むMUC1（20A）に比較して、

MUC1を発現するB4細胞に対して強い反応性を持つ抗体を誘導した。しかしながら、この効果は、もっと長いペプチド（30アミノ酸）をテストとしたときには失われていた。

免疫感作していない癌患者におけるMUC1ペプチドに対するTリンパ球免疫については、文献に記載されている（24、25）。本研究において、出願人は、KLH+QS-21

に接合した合成MUC1ペプチドで免疫感作されたマウスにおいて、T細胞反応をテストした。QS-21は免疫学的アジュバントであり、他の溶解性蛋白抗原に対するCTLを誘導できる事が知られている(29)。しかしながら、出願人は、免疫感作後に、MUC1抗原又はMUC1陽性細胞に対するT細胞の反応(DTH、リンパ球増殖又はCTL)を観測しなかった。他の研究者は、合成MUC1ペプチド、MUC1接合体、MUC1を発現するワクチン、又は全腫瘍細胞上で発現されるMUC1によって、T細胞反応を誘導しようと試みた(5、26-28)。ジフテリア・トキソイドと結合させたMUC1、グルタチオンSトランスフェラーゼと融合させたMUC1(20アミノ酸)、または天然ムチン(ヒ乳脂肪小球)+完全フロイトアジュバントでマウスを免疫感作する事により、マウスにおいてT細胞反応を誘導することは、アポストロプロスラ(Apostolopoulos et al)(26)によっても失敗に終わった。しかし、出願人が実証できたように、MUC1抗原を発現する腫瘍全細胞でマウスを免疫感作した後にT細胞反応が観察された。デイングラ(Ding et al)は、MUC1(16アミノ酸)-KLHで免疫感作されたマウスにおいて、インビトロの免疫反応ではなく、DTHを報告している(27)。これらの異なる観測は、異なるマウス種を使用した事に起因するのかもしれない。一つの縦列繰り返し(20aa)に対応するMUC1ペプチドによるT細胞反応誘導は行われなかったが、フィン(Finn et al)らは、5つの縦列繰り返しに対応するMUC1ペプチドがCTL誘導の能力を持つ事を発見した(30)。より長いMUC1ペプチドは、KLHと接合していても接合していなくても、この能力を持つかどうかが今後の研究の焦点となる。天然ムチンアミノ酸配列、及びクラス

I MUC分子と会合したペプチドモチーフは、ヒトよりもマウスにおいて異なるから(6、31)、ヒトにおけるMUC1抗原に対するT細胞反応は、マウスにおいてみられるものとは若しく違っているかもしれない。乳癌、卵巣癌、膵臓癌の非免疫感作患者で既に確認されているMUC1に対するCTLは、これがそうであることを示唆する(24、25)。

免疫感作後にMUC1に対するT細胞免疫が検出されていないにも拘わらず、MUC1陽性E4細胞での抗原投与に対する防御が見られた。MUC(30)-KLH+QS-21で免疫感作されたマウスにおける肺の転移数は、PBS又はKLH+QS-21コントロール群につ

いての転移数よりも顕著に低かった。このことから、体液性免疫が、MUC1を発現するE4腫瘍細胞での抗原投与に対する抵抗性の原因であることが示唆される。他の研究者等は、齧歯類において、免疫感作後MUC1陽性腫瘍細胞による誘導から保護された事もまた記載している。MUC1発現するE3細胞(27)を用いた誘導後に、MUC1を発現するワクシニア組替体で免疫感作されたフィッシャー(Fisher)ラットにおいてはムチンを発現する腫瘍の顕著な拒絶反応が起こり(5)、またMUC1接合BP-1-7-KLH(GVTSAPDTRPAGSTA)(配列認識番号1)で免疫感作されたCAF1マウスの生存が長くなった事が記載されている(27)。BP-1-7-KLHで免疫感作されたマウスにおいてDTT反応がみられたが、CTL反応は記載されていない。よって、免疫系のどの部分が腫瘍誘導の防御に本質的に関与するのかを、齧歯類モデルでの結果から知るのは困難である。よってMUC1ワクチンの免疫原性を至適化するために企画されたフェーズI/II臨床試験において、どの免疫分析を続けるのが最も重要になるかを予測するのは困難である。

MUC1に対するCTL及び抗体反応については、乳癌、卵巣癌、膵臓癌の未免疫感作患者において記述されてきた(2、23-25)。患者におけるMUC1に対する免疫性が、腫瘍ワクチンで処置する事により増大できるかどうかを決定する事がまだ残されている。今までは、進行した乳癌患者をBCGと混

合された105アミノ酸MUC1ペプチド(5縦列繰り返し)で免疫感作する一つの試みが行われたに過ぎない(30)。最終結果は入手されていないが、抗MUC1抗体およびDTTは何れも一貫して増大しなかったようだ。しかしながら、免疫感作前の血液と比べて免疫感作後の血液では、HIAで規制されない抗MUC1CTL前駆体が2-3倍に増大した(O. J. Finn, Personal communication)。しかしながら、疾患の進行した患者におけるこれらの結果は、アジュバントのセッティングには応用できないであろう。我々の結果は、MUC1に対するIgG抗体及びIgM抗体を誘導する事について、MUC1-KLH接合物はMUC1+BCGよりもはるかに有望である事を実証した。MUC1抗原に対するT細胞反応は我々の研究では観測されなかったが、合成MUC1、MUC1を発現するネズミおよびヒト腫瘍細胞に対する高力価の抗体は全マウスにおいて誘導でき、この事は、MUC1を発現するE4腫瘍細胞による抗原投与からの顕著な

防御に関連していた。これに基づき、出願人は、MRSリンカー+QS21を使用して調整されるMUC1-KLH(30アミノ酸)による臨床試験を開始しており、90アミノ酸MUC1ペプチドも、この条件で試験することを計画している。体液性DTNに対する分析、増殖性、及びCTL反応も続けて行うつもりである。

ヒトムチンMUC1は、上皮細胞起源の多くの癌で多量に発現され、その大部分は、正常組織における分泌細胞の先端表面に隈られる。よって、それは癌の免疫治療の有望なターゲットである。臨床試験の準備において、異なる長さで配列の合成MUC1ペプチドを含み、且つ種々のアジュバントと混合され、または蛋白担体であるキーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) に共有結合されたワクチンが、ネズミにおいて研究された。(20及び30アミノ酸を含む) MUC1ペプチド+アジュバントQS-21又は+BCGは、抗体を誘導しなかった。しかしながら、特にリンカーのマレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシニミド エステル (MBS) によってKLHに接合されたMUC1ペプチド (MUC1-KLH) にQS-21を付加したものは、免疫性ペプチ

ドに対して高力価抗体、つまり、IgGに対して平均力価1:800、IgGに対して1:307、200を誘った。更に、これらの抗血清は、MUC-1反応性のmAb HMPG-2と同様に、MUC1を発現するネズミ腫瘍E4細胞及びヒト乳癌MCF-7細胞と強く反応性した。これらの研究に基づいて、リンカー-MRS+QS-21を用いて調製したMUC1-KLH接合体を含むワクチンを、臨床試験の試験のために構築した。

< 参考文献 >

1. Arklie, J., Taylor-Paradimitriou, J., Bodmer, W., Egan, M., and Millis, R. Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers. *Int. J. Cancer*, 28:23-29, 1981.
2. Kotera Y., Fontenot, J. D., Pecher, G., Metzgar, R. S., and Finn, O. J. Human immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res.*, 54:2856-2860, 1994.
3. Devine, P. L., Layton, G. T., Clark, B. A., Birrell, G. W., Ward, B. G., Xing, P. X., and McKenzie, F.C. Production of MUC1 and MUC2 mucins by human tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178:593-599, 1991.
4. Hollingsworth, M. A., Strawhecker, J. M., Caffrey T. C., and Mack, D. R. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 57:198-203, 1994.
5. Hareuveni, M., Gautier, C., Kieny, M.-P., Wreschner, D., Chambon, P., and Lathe, R. Vaccination against tumor cells expressing breast cancer epithelial tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:9498-9502, 1990.
6. Gendler, S. J., Spicer, A. P., Lalani, E.-N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., and Taylor-Papadimitriou, J. Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:S42-S47, 1991.
7. Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S., and Duhig, T. A short sequence, within the

amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, 44:691-696, 1989.

8. Fontenot, J. D., Tjandra, N., Bu, D., Ho, C., Montelaro, R. C., and Finn, O.J. Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res.*, 53:5386-5394, 1993.

9. Perez, L., Hayes, D. F., Maimonis, P., Abe, M., O'Hara, C., and Kufe, D. W. Tumor selective reactivity of a monoclonal antibody prepared against a recombinant peptide derived from the DF3 human breast carcinoma-associated antigen. *Cancer Res.*, 52:2563-2568, 1992.

10. Taylor-Papadimitriou, J., Peterson, J. A., Arklie, J., Burchell, J., Ceriani, R. L., and Bodmer, W. F. Monoclonal antibodies to epithelium specific components of the milk fat globule membrane: production and reactions with cells in culture. *Int. J. Cancer*, 28:17-21, 1981.

11. Miller, F. R., Miller, B. E., and Heppner, G. H. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis*, 3:22-31, 1983.

12. Lalani, E.-N., Berdichevsky, F., Boshell, M., Shearer, M., Wilson D., Stauss, H., Gendler, S. J., and Taylor-Papadimitriou, J. Expression of the gene coding for a human mucin in mouse mammary tumor cells can affect their tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 266:15420-15426, 1991.

13. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1409-1416, 1973.

14. Maloy, W. L., Coligan, J.E., and Paterson, Y. Production of anti-peptide antisera. In *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 9.4.1-9.4.11. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.
15. Carlesson, J., Drevin, H., and Axen, R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.*, 173:727-737, 1978.
16. Kensil, C.R., Patel, U., Lennick, M., and Marciani, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria molina* cortex. *J. Immunol.*, 146:431-437, 1991.
17. Livingston, P.O., Ritter, G., and Calves, M.J. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2, and GD3 in the mouse. *Cancer Immunol. Immunother.*, 29:179-184, 1989.
18. Zhang, S., Helling, F., Lloyd, K. O., and Livingston, P. O. Increased tumor cell reactivity and complement-dependent cytotoxicity with mixtures of monoclonal antibodies against different gangliosides. *Cancer Immunol. Immunother.*, 40:88-94, 1995.
19. James S. P. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. In *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 7.10.1-7.10.10. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.
20. Luo, Y., and Dorf, M. E. Delayed-type hypersensitivity. In *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 4.5.1-4.5.5. John Wiley & Sons, Inc. New York,

1994.

21. Wunderlich, J. and Shearer, G. Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 3.11.1-3.11.15. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.

22. Dohi, T., Nores, G. A., Oguchi, H., Inufusa, H., and Hakomori, S. GD3 lactone as an immunogen associated with melanoma: effect of immunization with GM3' lactone on melanoma growth in vivo. In *Gangliosides and Cancer* (H. F. Oettgen, eds.) pp 275-281, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Germany) and VCH Publishers (New York, U.S.A.), 1988.

23. Rughetti A., Turchi V., Ghetti C. A., Scambia, G., Panici, P. B., Roncucci, G., Mancuso, S., Frati, L., and Nuti, M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res.*, 53:2457-2459, 1993.

24. Jerome, K. R., Barnd, D. L., Bendt, K. M., Boyer, C. M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I. F. C., Bast, R. C. Jr., and Finn, O. J. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.*, 51:2908-2916, 1991.

25. Ioannides, C. G., Fisk, B., Jerome, K. R., Irimura, T., Wharton, J. T., and Finn, O. J. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J. Immunol.*, 151:3693-3703, 1993.

26. Apostolopoulos, V., Xing, P-X., and McKenzie, F. C. Murine immune response to cells transfected with human

MUC1: immunization with cellular and synthetic antigens. Cancer Res., 54:5186-5193, 1994.

27. Ding, L., Lalani, E-N., Reddish, M., Koganty, R., Wong, T., Samuel, J., Yacyszyn, M. B., Meikle, A., Fung, P. Y. S., Taylor-Papadimitriou, J., and Longenecker, B. M. Immunogenicity of synthetic peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC1 mucin gene: effect of immunization on the growth of murine mammary adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. Cancer Immunol. Immunother., 36:9-17, 1993.

28. Bu, D., Domenech, N., Lewis, J., Taylor-Paradimitriou, J., and Finn, O. J. Recombinant vaccine mucin vector: in vitro analysis of expression of tumor-associated epitopes for antibody and human cytotoxic T-cell recognition. J. Immunol., 14:127-135, 1993.

29. Newmann, M. J., Wu, J-Y., Gardner B. H., Munroe, K. J., Leonbruno, D., Recchia, J., Kensil, C.R., and Coughlin, R. T. A sponin adjuvant induction of ovalbumen-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses. J. Immunol., 148:2357-2360, 1992.

30. Finn, O. J. Immunity to epithelial tumors and mucin-based vaccine design. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 36:675, 1995.

31. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and Class II MHC molecules. Annu. Rev. Immunol., 12:181-207, 1994.

第二実験シリーズ

ムチンMUC-1は糖化された構造で乳癌腫瘍上で発現され、従って、免疫認識のターゲットである。MUC-1の30のアミノ酸 (aa) 配列は合成されており、その免疫原性を増大させるために、KLHに共有結合で連結され、免疫アジュバントQS21と共に混合された。資格基準には、ステージ4のNED患者(疾病形跡なし)、CE A又はCA15-3レベルが上昇してNEDである患者、又は最初は切除不能段階の患者であってアジュバント治療(1x)後である患者が含まれる。夫々がMUC-1ペプ

チドを100mcg含む5つのワクチンが1、2、3、7及び19週間目に賦与された。このように、5人をはるかに超える患者について研究中であるが、5患者のみは、3回以上のワクチン接種を受けた。注入部位の局所的紅斑及び硬化、軽いインフルエンザ様症状（これらは#2のワクチン処置後に最も顕著であった）が、すべての患者で観察された。患者の血清を、精製されたMUC-1に対するIgG及びIgM抗体についてはELISA法で分析され、また、MUC-1陽性、陰性細胞系に対するIgG及びIgM抗体については免疫粘着ロゼット分析で分析した。最初の5患者に対するELISAによるIgM/IgG力価は、下記の通りであった。

週 #	0	3	8	20
Pt #1	0/0	10240/40	2560/160	320/1280
Pt #2	0/0	180/640	2560/2560	
Pt #3	0/0	2560/320	2560/2560	
Pt #4	0/0	1280/80	2560/2560	
Pt #5	0/0	320/320	640/320	

Pt #1からPt #4についての、MCF-7細胞に対するIgM反応性を測定する免疫粘着分析では、治療前は0であった力価が9週までに力価160に上昇した。治療前の力価80でスタートした第5番目の患者（Pt #5）は、9週までに160まで増加した。MUC-1ムチンは、KLH及びQS21を含むワクチン中に存在するときに、乳癌患者において強力な免疫原性である。

第三実験シリーズ

ステージIVの疾病の形跡のない（NED）乳癌患者（BCPts）、或いはCEAもしくはB R2729レベルが上昇している以外は初期ステージにあるBCPtsは、明らかに再発の危険が高く、免疫治療からの恩恵を得る可能性がある。ほとんどの乳癌腫瘍にみられるムチンMUC-1は有望なターゲットである。MUC-1の30合成アミノ酸（aa）の配列が、免疫認識を高めるためにKLHと接合され、免疫アジュバントQS1と混合された。9人の患者（年齢43-61）がワクチン処置された。8人はステージIVのNE Dであり、一人はCEAレベルが増大したステージIIのNEDであった。ステージI VのNED患者一人を除くすべての患者は、ホルモン治療中であった。全患者は、100

mcgMUC-1 s.c. の投与を、1、2、3、7及び19週に5回受けた。全患者は、ワクチン投与部位に2回の一過性の局所的毒性が現れ、殆どは、グレード1-2のインフルエンザ様症状を呈した。すべての患者はNEOを維持していた（平均55週まで追跡した）が、1患者は、胸板再発を示し、これは切除された。

全患者について、精製MUC-1に対するIgM及びIgGのELISA法による力価逆数の範囲は次の通りであった。

週 数	IgM 力価	IgG 力価
0	0-160	0-10
3	10-20、480	0-320
5	1280-20、480	40-20、480
13	10-20、480	160-2560
21	320-30、480	640-10、240

5人の患者は、最終ワクチン処理後6-12月の間、IgG力価（320-1280）を維持している。8人の患者中のIgGサブクラスを分析すると、IgG1及びIgG3が優先していることが解明された。MCF-7細胞系に対する免疫粘着ロゼット分析では、6/7の患者においてIgM力価の増加がみられた。阻

止分析において、すべての血清は、MUC-1のAPDTRPA決定因子とのみ反応する事が実証された。T細胞免疫を増大させる証拠は何も発見されなかった。このMUC-1ワクチンはNEOの乳癌患者において免疫原性である。

第四実験シリーズ

ムチンMUC-1は、正常組織と比較すると糖化されない形で乳癌上で発現され、従って癌免疫治療の有望なターゲットである。MUC-1は、20アミノ酸ペプチドの多重の複列繰り返し(VTSAPDTRPAPGCTAPPAPHG)を含んでいる。APDTRエпитープは、様々なネズミのモノクローナル抗体及び免疫血清によって認識され、また上皮細胞癌で免疫感作されていない患者から得られたある血清及び細胞毒性T細胞によって認識されるので、特に免疫原性である。キーホール・リンベット・ヘモシアンin (KLH) に対して化学接合させるために、N末端にシステインを有する下記の30アミノ酸ペプチドVTSAPDTRPAPGCTAPPAPHGCVSAPDTRPAを調整した。この接合

物プラス免疫学的アジュバントQS21とで設定される該アジュバント中で免疫処置された6人の乳癌患者では、全て該30アミノ酸MUC-1ペプチドに対する高力価(ELISAによる)のIgG及びIgM抗体が産生された。一連の小ペプチドを調整して、これらの免疫血清によって認識されるエピトープを阻害分析で決定した。APDTRPAを含むペプチドのみが、完全な30アミノ酸ペプチドに対するELISA反応性を阻害する事ができた。APDTR, APDTRP, PUTRPA又は完全なAPDTRPAエピトープを含まない他の何れのペプチドによっても、血清は阻害されなかった。注目すべきことに、全6患者から得られた血清はこの同じエピトープを認識し、且つ認識したのはこのエピトープのみであった。反応性は最高であったが、APDTRPAが該ペプチドのC末端にあるときは、APDTRPAは当該免疫原の末端であるので、優先的に認識されるという可能性が生じる。別の患者群では、C末端に他のアミノ酸をもつMUC-1ペプチド含んだ接合体ワクチンで免疫感作することを計画している。

配 列 表

(1) 一般情報

(i)出願人：リビングストーン、フィリップ O

ツェンガ、シェンダ

(ii)発明の名称：ムチン接合体ペプチドワクチン

(iii)配列の数：7

(iv)通信宛先：

(A)名宛人：クーバー・アンド・ダンハム LLP

(B) 通り：1185 アヴェニュー・オブ・ジ・アメリカズ

(C)市：ニューヨーク

(D)州：ニューヨーク

(E)国：アメリカ合衆国

(F)郵便番号：10036

(v)コンピュータ読取り可能な形態：

(A)媒体タイプ：フロッピーディスク

(B)コンピュータ：IBM・PCコンパチブル

(C)オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウェア：Patent In リリース #1.0、バージョン#1.30

(vi)現在の出願データ：

(A)出願番号：

(B)出願日：

(C)分類：

(vii)アトニー/エージェント情報：

(A)氏名：ホワイト、ジョン P.

(B)登録番号：28, 678

(C)参照/ドケット番号：50397-A-PCT/JPW/AKC

(ix)電信情報：

(A)電話：212-278-0400

(B)テレファックス：212-391-0525

(2) 配列認識番号：1のための情報：

(i)配列特性：

(A)長さ：16アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列の記載：配列認識番号：1：

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 1 5 10 15

(2) 配列認識番号：2のための情報：

(i)配列特性：

(A)長さ：21アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列の記載：配列認識番号：2：

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 1 5 10 15

Gly Val Thr Ser Cys
 20

(2) 配列認識番号：3のための情報：

(i)配列特性：

(A)長さ：21アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列の記載：配列認識番号：3：

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Cys
 20

(2) 配列認識番号: 4 のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列の記載: 配列認識番号: 4:

Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
1				5				10						15	
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Cys	
			20					25					30		

(2) 配列認識番号: 5 のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列の記載: 配列認識番号: 5:

Cys	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala
1				5				10						15	
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	
			20					25					30		

(2) 配列認識番号: 6 のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 51 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA (genomic)

(xi)配列の記載：配列認識番号：6：

Cys Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15
Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
20 25 30
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
35 40 45
Arg Pro Ala
50

(2) 配列認識番号：7のための情報：

(i)配列特性：

(A)長さ：20アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類: DNA (genomic)

(xi)配列の記載：配列認識番号：7；

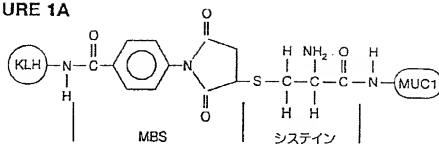
```

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly
1      5      10     15
Val Thr Ser Ala
      20

```

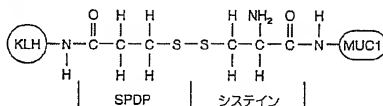
【図1】

FIGURE 1A



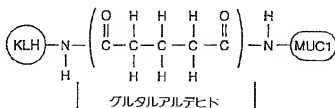
MBS リンカー

FIGURE 1B



SPDP リンカー

FIGURE 1C



グルタルアルデヒドリンカー

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US97/04493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G07K 7/04; A61K 38/17

US CL : A24/184.1, 185.1, 193.1; 514/2; 530/300, 324, 326

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/184.1, 185.1, 193.1; 514/2; 530/300, 324, 326

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Search terms: mucin, vaccine, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
X ----- Y	DING et al. Immunogenicity of Synthetic Peptides Related to the Core Peptide Sequence Encoded by the Human MUC1 Mucin Gene: Effect of Immunization on the Growth of Murine Mammary Adenocarcinoma Cells Transfected with the Human MUC1 Gene. Cancer Immunol. Immunother. 1993, Vol 38, pages 9-17, see entire document.	1, 3-4, 6, 9, 13-15, 17-19, 21, 23, 25, 28, 32 2, 5, 10-12, 16, 20, 22, 24, 29- 31, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Symbolic description of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" has document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document members of the same patent family

Date of the actual completion of the international search


22 MAY 1997

Date of mailing of the international search report

21 JUL 1997

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer: 

NANCY A. JOHNSON

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US97/04493

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	APOSTOLOPOULUS et al. Murine Immune Response to Cells Transfected with Human MUC1: Immunization with Cellular and Synthetic Antigens. Cancer Research. 01 October 1994, Vol. 54, pages 5186-5193, see entire document.	1,2,4,6,9,13-20,23,25,28,32-33 ----- 3,5,10-12,21-22,24,29-31
Y	FINN. Immunity to Epithelial Tumors and Mucin-Based Vaccine Design. Proceedings of the American Association for Cancer Research. March 1995, Vol. 36, page 675, see entire document.	1-6, 9-25, 28-33
Y	HOLLINGSWORTH et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 MUCIN mRNAs in Human Pancreatic and Intestinal Tumor Cell Lines. Int. J. Cancer. 1994, Vol. 57, pages 198-203. see entire document.	5, 24
Y	US 5,455,034 A (NAGARAJA and CHENGAPPA) 03 October 1995, column 14, lines 26-32.	10-12, 22, 29-31
X — Y	US 5,229,289 A (KJELDSEN et al.) 20 July 1993, see entire document.	1-2, 9, 13-20, 32, 33 ----- 3-6, 10-12, 21-25, 28-31

フロントページの続き

(72)発明者 ザング、シェンゲル
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10028、
ニューヨーク、イースト・エイティーフア
ースト・ストリート 504、アパートメン
ト 4エル



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07K 7/04, A61K 38/17		A1	(11) International Publication Number: WO 97/34921
			(43) International Publication Date: 25 September 1997 (25.09.97)
(21) International Application Number: PCT/US97/04493			Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(22) International Filing Date: 20 March 1997 (20.03.97)			
(30) Priority Data: 60/013,775 20 March 1996 (20.03.96) US			
(66) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 60/013,775 (CIP) Filed on 20 March 1997 (20.03.97)			
(71) Applicant (for all designated States except US): SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 1275 York Avenue, New York, NY 10021 (US).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LIVINGSTON, Philip, O. [US/US]; Apartment 6C, 156 East 79th Street, New York, NY 10021 (US). ZHANG, Shengle [CN/US]; Apartment 4L, 504 East 81st Street, New York, NY 10028 (US).			
(74) Agent: WHITE, John, P.; Cooper & Dunham L.L.P., 1185 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).			
(54) Title: CONJUGATED MUCIN PEPTIDE VACCINES			
(57) Abstract			
<p>This invention provides a vaccine capable of producing an immune response which recognizes a mucin, comprising an amount of mucin peptide conjugated to an immunogenic protein effective to stimulate or enhance immune response in the subject, an effective amount of an adjuvant and a pharmaceutically acceptable vehicle. This invention further provides a method for stimulating or enhancing production of an immune response which recognizes a mucin, comprising administering to the subject the above-described vaccine.</p>			

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

CONJUGATED MUCIN PEPTIDE VACCINES

5 The invention disclosed herein was made with government support under NIH Grant No. CA 61422 from the Department of Health and Human Services. Accordingly, the U.S. Government has certain rights in this invention.

10 Background of the Invention

Throughout this application, various references are referred to within parentheses. Disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by
15 reference into this application to more fully describe the state of the art to which this invention pertains. Full bibliographic citation for these references may be found at the end of this application, preceding the claims.

20 Mucins, such as the mucin MUC1, are extensively glycosylated high molecular weight (> 200 kD) proteins abundantly expressed in many human cancers of epithelial origin (1-5). Recent studies have demonstrated that MUC1
25 contains a variable number of tandem repeats of a 20 amino acid peptide (PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA) (SEQ ID. 7) in the extracellular portion of the molecule and that the most antigenic epitome recognized by anti-mucin mAbs and cytotoxic T cells is the APDTR segment within the repeats
30 (6-8). Expression of MUC1 on normal tissues is largely restricted to the apical surface of secretory cells (1, 4), a site with minimal access to the immune system. In addition, the extensive glycosylation of MUC1 expressed on normal tissues may further limit the immune system exposure to the peptide backbone. It has been suggested that the
35 peptide backbones of mucins are not fully glycosylated in carcinomas, resulting in exposure to the immune system of peptide sequences which are not normally exposed (6). Consequently, MUC1 peptide specific monoclonal antibodies show specificity for carcinoma-associated mucins from

cancers of breast, pancreatic and ovary origin though the amino acid sequences in both normal and carcinoma mucins are probably the same (9). Immunization of rats with a vaccinia recombinant expressing MUC1 has resulted in protection from challenge with MUC1-expressing tumor cells (5). These findings have suggested that immunization against MUC1 may be possible and that this immunization might prevent tumor regrowth in patients with breast or pancreatic cancer. In this study, applicants' synthesized MUC1 peptides of different lengths and sequences and prepared vaccines containing these peptides mixed with various adjuvants or covalently attached them using different linkers to the protein carrier keyhole limpet hemocyanin (KLH). In preparation for clinical trials, the impact of the different vaccines on humoral and cellular immunological responses and protection from tumor challenge was compared in mice.

Human mucin MUC1 is abundantly expressed in some cancers of epithelial origin and is largely restricted to the apical surface of secretory cells in normal tissues. It is therefore a potential target for cancer immunotherapy. In preparation for clinical trials, vaccines containing synthetic MUC1 peptides of different lengths and sequences mixed with various adjuvants or covalently attached, using different linker methods, to protein carrier keyhole limpet hemocyanin (KLH) were studied in mice. MUC1 peptides (containing 30 amino acids), plus adjuvants QS-21 or BCG, were incapable of inducing antibody. However, MUC1 peptide conjugated to KLH (MUC1-KLH), plus QS-21, induced high titer antibody against the immunizing peptides and against MUC1-expressing tumor cells. Although T cell responses including delayed type hypersensitivity, lymphocyte proliferation and cytotoxic T lymphocyte were not observed in mice immunized with any of these vaccines, significant protection from MUC1-expressing tumor cell challenge in mice immunized with MUC1-KLH was observed. Based on these

studies, a vaccine containing MUC1-KLH conjugate prepared with m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester linker, plus QS-21, has been constructed for testing in clinical trials.

Summary of the Invention

This invention provides a vaccine capable of producing an immune response which recognizes a mucine, comprising an amount of mucin peptide conjugated to an immunogenic protein effective to stimulate or enhance immune response in the subject, an effective amount of an adjuvant and a pharmaceutically acceptable vehicle.

In an embodiment, the subject is a human.

In another embodiment, the immunogenic protein is Keyhole Limpet Hemocyanin or a derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin.

In a separate embodiment, the mucin is MUC1. The mucin may include other mucins such as MUC 2-5. A person of ordinary skill in art would be able to apply this invention in other mucins.

In a further embodiment, the MUC1 peptide ranges from ten amino acids to three hundred amino acids in length.

In an embodiment, the effective amount of conjugated MUC1 peptide is an amount between about 1 μ g and about 1mg. In another embodiment, the adjuvant is QS-21.

In an embodiment, the effective amount of QS-21 is an amount between about 10 μ g and about 200 μ g. In an separate embodiment, the effective amount of QS-21 is about 100 μ g.

In another embodiment, the subject is afflicted with cancer and the immune response produced in the subject upon administration of the vaccine effectively treats the cancer. In a further embodiment, the subject is susceptible to cancer and the immune response produced in the subject upon administration of the vaccine effectively prevents the

cancer. In an embodiment, cells of the cancer have the mucin on their surface.

5 In a further embodiment, the cancer is a breast cancer, prostate cancer, colon cancer, lung cancer or pancreas cancer. This invention is applicable to other cancers of epithelial origin.

10 This invention also provides a method of producing an immune response which recognizes the mucin comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

15 This invention provides a method for treating cancer in a subject afflicted with cancer comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

20 This invention provides a method for preventing cancer in a subject susceptible to cancer comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

25 In the above methods, the immunogenic protein may be Keyhole Limpet Hemocyanin or a derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin. In an embodiment of the above methods the adjuvant is QS-21.

Brief Description of the Figures

Figure 1 Conjugation of MUC1 to KLH.

Detailed Description of the Invention

5 This invention provides a vaccine capable of producing an immune response which recognizes a mucin, comprising an amount of mucin peptide conjugated to an immunogenic protein effective to stimulate or enhance immune response in the subject, an effective amount of an adjuvant and a pharmaceutically acceptable vehicle. In an embodiment, the subject is a human.

10 The effective amount of the conjugated mucin peptide may easily be determined by simple titration experiment. Animals may be immunized with different amounts of the conjugated peptide and tested with the immune response
15 generated. The effective amount will generate an appropriate immune response.

In another embodiment, the immunogenic protein is Keyhole Limpet Hemocyanin or a derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin. Other appropriate immunogenic proteins may
20 also be used in this invention. An ordinary skilled artisan may test the appropriateness of an immunogenic protein by conjugating the tested immunogenic protein with a mucin peptide known to be capable of eliciting an immune
25 response. The mucin peptide conjugated may be administered in animals to test whether it can generate good immune responses. Proteins with good immune response are the appropriate immunogenic proteins.

30 In a separate embodiment, the mucin is MUC1. The mucin may include other mucins such as MUC 2-5. A person of ordinary skill in the art would be able to apply this invention in other mucins.

35 In a further embodiment, MUC1 peptide ranges from thirty amino acids to three hundred amino acids in length. In a specific embodiment, the mucin peptide is selected from a

- 8 -

group consisting of APDTRPAPGSTAPPAHGVTS,
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS,
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA, and
(VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₂VTSAPDTRPA. In a further specific
5 embodiment, the mucin peptide is
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA.

In a preferred embodiment, the effective amount of
conjugated MUC1 peptide is an amount between about 1 μ g and
10 about 1mg.

In another embodiment, the adjuvant is QS-21. As it can be
readily appreciated by persons of ordinary skill in the
art, other appropriate adjuvants may be similarly used.

15 In a preferred embodiment, the effective amount of QS-21 is
an amount between about 10 μ g and about 200 μ g. In a further
preferred separate embodiment, the effective amount of QS-
21 is about 100 μ g.

20 In another embodiment, the subject is afflicted with cancer
and the immune response produced in the subject upon
administration of the vaccine effectively treats the
cancer.

25 In a further embodiment, the subject is susceptible to
cancer and the immune response produced in the subject upon
administration of the vaccine effectively prevents the
cancer. In an embodiment, cells of the cancer have the
30 mucin on their surface.

In a further embodiment, the cancer is a breast cancer,
prostate cancer, colon cancer, lung cancer or pancreas
cancer. This invention is applicable to other cancers of
35 epithelial origin.

This invention also provides a method for stimulating or

enhancing in a subject production of an immune response which recognizes the mucin comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

5 This invention provides a method for treating cancer in a subject afflicted with cancer comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

10 This invention provides a method for preventing cancer in a subject susceptible to cancer comprising administering to the subject an effective dose of the above-described vaccine.

15 In the above methods, the immunogenic protein includes, but is not limited to Keyhole Limpet Hemocyanin or a derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin.

20 In an embodiment of the above methods, the adjuvant is QS-21.

In a separate embodiment, the mucin is MUC1. The mucin may include other mucins such as MUC 2-5. A person of ordinary skill in the art would be able to apply this invention in
25 other mucins.

The mucin may include other mucins such as MUC 2-5. A person of ordinary skill in art would be able to apply this invention in other mucins.

30 In a further embodiment, MUC1 peptide ranges from thirty amino acids to three hundred amino acids in length. In a specific embodiment, the mucin peptide is selected from a group consisting of APDTRPAPGSTAPPAGVTS,
35 TAPPAGVTSAPDTRPAPGS, APDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPAPGS, VTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPA, and (VTSAPDTRPAPGSTAPPAGH)₂VTSAPDTRPA. In a further specific

embodiment, the mucin peptide is
VTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPA.

5 In a preferred embodiment, the effective amount of
conjugated MUC1 peptide is an amount between about 1 μ g and
about 1mg.

10 In another embodiment, the adjuvant is QS-21. As it can be
readily appreciated by persons of ordinary skill in the
art, other appropriate adjuvants may be similarly used.

15 In a preferred embodiment, the effective amount of QS-21 is
an amount between about 10 μ g and about 200 μ g. In a further
preferred separate embodiment, the effective amount of QS-
21 is about 100 μ g.

In an embodiment, cells of the cancer have the mucin on
their surface.

20 In a further embodiment, the cancer is a breast cancer,
prostate cancer, colon cancer, lung cancer or pancreas
cancer. This invention is applicable to other cancers of
epithelial origin.

25 This invention will be better understood from the
Experimental Details which follow. However, one skilled in
the art will readily appreciate that the specific methods
and results discussed are merely illustrative of the
invention as described more fully in the claims which
30 follow thereafter.

Experimental DetailsFIRST SERIES OF EXPERIMENTS

5

MATERIALS AND METHODS

Materials. Peptides. MUC1 peptides containing 20, 30 and 50 amino acids with different sequences were synthesized using an Applied Biosystems Model 431A automated peptide synthesizer in the Core Facilities of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. A cysteine was added as indicated to the original sequence at the C- or N-terminal of the synthetic peptides to facilitate conjugation with protein carriers (Table 1).

Table 1 Sequences of Synthetic MUC1 Peptides Used For Vaccine Preparation and Testing

20	Peptide	Amino Acid Sequence
	MUC1(20A)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTS (C) (SQ ID 2)
	MUC1(20)	TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS (C) (SQ ID 3)
25	MUC1(30A)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS (C) (SQ ID 4)
	MUC1(30)	(C)VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA (SQ ID 5)
30	MUC1(50)	(C)(VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG) ₂ VTSAPDTRPA (SQ ID 6)

MAbs and cell lines. HMFG-2 is a MUC1-reactive mouse IgG mAb (10). 410.4 is a murine (BALB/c) mammary epithelial cancer cell line (11) and E4 is derived from a clone of 410.4 cells transfected with the MUC1 gene (12). HMFG-2, 410.4 and E4 were kindly provided by Dr. Joyce Taylor-Papadimitriou (Imperial Cancer Research Fund, London, U. K.). MCF 7 is a human breast carcinoma cell line (13).

40

Animals and adjuvants. Female BALB/c x C57BL/6 F1 mice,

BALB/c x C3H F1 mice , or BALB/c mice, 6 weeks of age, were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Adjuvant QS-21, a purified saponin fraction (16), was obtained from Cambridge Biotech, Inc. (Worcester, MA).
5 Bacille Calmette-Guerin (BCG) was purchased from Connaught Laboratories (Ontario, Canada).

Conjugation of MUC1 peptides to keyhole limpet hemocyanin (KLH). KLH (PerImmune Inc., Rockville, MD) was used as
10 carrier protein for MUC1 peptide conjugates. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS, Pierce Co., Rockford, IL), N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP, Pierce Co., Rockford, IL) and glutaraldehyde (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) were
15 used as linkers for making MUC1 peptide conjugates (Fig.1).

MBS conjugation method (14). One mg MBS in 70 μ l dimethylformamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added to 5 mg KLH in 1 ml 0.01 M phosphate buffer (PB) pH
20 7.0. One hour later, MBS/KLH solution was applied on Sephadex G-15 column equilibrated with 0.1 M PB pH 6.0. The first peak at OD280 (MBS-KLH) was collected and mixed with 5 mg MUC1 peptide and stirred at room temperature for 2 hours. The unconjugated peptide was separated from MUC1-KLH
25 conjugate using a Centriprep-30 concentrator (Amicon Inc., Beverly, MA). The MUC1/KLH conjugation ratio (500/1 - 600/1) was calculated based on the starting amount of peptide and KLH and the amount of unconjugated peptide in the filtrate by spectrophotometer.

30 SPDP conjugation method (15). Conjugation by the SPDP method was similar to that by the MBS method except that MBS was replaced by SPDP. The conjugate ratio of MUC1/KLH resulting from the SPDP method was calculated in 2
35 different assays: 1) based on the amount of unconjugated peptide, and 2) based on the SPDP by-product (pyridine-2-thione) produced by the conjugation reaction. The MUC1/KLH

ratio was 400/1 -500/1 by both assays.

5 Glutaraldehyde conjugation method (14). Five mg KLH in 1 ml borate buffer pH 10 was mixed with 5 mg MUC1 peptide. One ml of 0.3% glutaraldehyde was added and stirred at room temperature for 2 hours. Unreacted glutaraldehyde was blocked by adding 0.25 ml 1 M glycine for 30 min. The MUC1-KLH solution was dialysed against PBS overnight. Because
10 glutaraldehyde interfered with the absorbance of unconjugated peptide at OD215, the ratio of MUC1/KLH was assumed based on the starting ratio, 500/1.

15 Vaccine preparation and administration. Mice were immunized with 8-15 μ g MUC1 peptide alone or conjugated to KLH plus 8-10 μ g QS-21 or 5×10^5 BCG, 2-3 times at one week intervals. Eight to ten days after the 2nd or 3rd immunization, mice were bled and the sera separated for testing with ELISA and flow cytometry assays.

20 Serological assays. ELISA. ELISAs were performed as previously described (17). MUC1 peptide in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 were coated on ELISA plates at 0.1 μ g/well. A series of antiserum dilutions were incubated with the coated peptide for 1 hour. Secondary antibodies were
25 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG or IgM at a dilution of 1/200 (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). ELISA titer is defined as the highest dilution yielding an absorbance of 0.1 or greater over that of normal mouse sera. MAb HMFG-2 was used as
30 positive control in each assay.

Flow cytometry. Tumor cells (2×10^5) were incubated with 40 l of 1/30 diluted antisera or 1/2 diluted mAb supernatant for 30 min on ice. After washing with 3% fetal calf serum/phosphate buffered saline, the cells were incubated
35 with 20 μ l of 1/15 diluted fluorescein-isothiocyanate-labeled goat anti-mouse IgM or IgG (Southern Biotechnology

Associates, Inc., Birmingham, AL). The positive population of the stained cells were quantitated by flow cytometry (EPICS-Profile II, Coulter Co., Hialeah, FL), as previously described (18).

5

T lymphocyte assays. Proliferative assay (19). Lymphocytes (2×10^5 /well) were prepared from the spleens of mice seven days after the 2nd immunization, and incubated with MUC1 peptide (0.1-10 $\mu\text{g/ml}$) or KLH (1-20 $\mu\text{g/ml}$) in $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ for 3-5 days. Eighteen hours after adding 0.5 μCi ^3H -Thymidine (ICN, Irvine, CA) per well, the cells were processed and analyzed with a 1204 Betaplate (Wallac Oy, Finland).

15 Delayed type hypersensitivity (DTH) (20). Two weeks after the 2nd immunization, 5 μg MUC1 peptide or KLH were injected in 20 μl PBS into the hind footpad. Footpad thickness was measured at 24 and 48 hours.

20 Cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay (21). Seven days after the 2nd immunization, splenic lymphocytes were sensitized in vitro with 1-8 $\mu\text{g/ml}$ MUC1 peptide and 10 unit/ml IL-2 (Boehringer Mannheim, Germany) for 7-10 days. The sensitized lymphocytes were then incubated with europium-labeled E4 or 410.4 cells at ratios of 10:1-100:1 for 4
25 hours. Percent release of europium from target cells were measured with a time-resolved 1232 Delfia fluorometer (Wallac Oy, Finland) (18).

30 Tumor challenge in mice. Three days after the 2nd immunization, mice were injected i.v. with 2×10^5 E4 cells. Twenty five days later, the mice were sacrificed, the lungs fixed with 10% formaldehyde, and the number of tumor colonies in the lungs were counted, as previously described
35 (22).

EXPERIMENTAL RESULTS

Effect of MUC1-KLH Vaccine Construction on Serological Response. Comparison of MUC1 peptides and MUC1 conjugates (Table 2). After 3 vaccinations, sera from 6 mice immunized with 15 μ g peptide MUC1(30) plus 10 μ g QS-21 or 5×10^5 BCG per vaccination failed to show significant titers of IgM or IgG antibody against MUC1, while sera from mice immunized with 15 μ g MUC1(30) conjugated with KLH plus 10 μ g QS-21 showed high titer IgG and modest titer IgM (median titer 1:409600 and 1:800, respectively). Sera from mice immunized with MUC1(30)-KLH, but not those immunized with unconjugated MUC1, also showed strong reactivity with MUC1-expressing E4 murine breast cancer cells and MCF 7 human breast cancer cells.

Table 2. Serological Response with Antisera from Mice Immunized with MUC1 Peptide or MUC1-KLH Conjugates*

		ELISA Titers On Immunizing Muc1 peptide		Flow Cytometry (IgG) % positive cells	
	Antisera	IgM	IgG	E4 cells	MCF7 cells
	<u>Controls</u>				
	unprimed mice 1	blank ^d	blank	4	5
	unprimed mice 2	blank	blank	2	4
	anti-GD3-KLH 1	< 1:20	< 1:25	2	5
	anti-GD3-KLH 2	< 1:20	< 1:25	4	7
	mAb HMFG-2	-	1:320	94	57
	<u>Muc1(30) + BCG</u>				
	G2-1	< 1:20	< 1:25	3	-
	G2-2	< 1:20	< 1:25	2	-
	G2-3	< 1:20	< 1:25	4	-
	G2-4	< 1:20	< 1:25	3	-
	G2-5	< 1:20	< 1:25	1	-
	G2-6	< 1:20	< 1:25	1	-
	<u>median</u>	<u>< 1:20</u>	<u>< 1:25</u>	<u>3</u>	<u>4^b</u>
	<u>Muc1(30) + QS21</u>				
	G3-1	< 1:20	< 1:25	1	-

	G3-2	< 1:20	< 1:25	1	-
	G3-3	< 1:20	< 1:25	1	-
	G3-4	< 1:20	< 1:25	1	-
	G3-5	< 1:20	< 1:25	1	-
5	G3-6	< 1:20	< 1:25	1	-
	<u>median</u>	<u>< 1:20</u>	<u>< 1:25</u>	<u>1</u>	<u>3^b</u>
	Muc1(30)-KLH +				
	QS21				
10	G5-1	1:400	1:819200	93	69
	G5-2	1:800	1:204800	66	25
	G5-3	1:800	1:819200	86	56
	G5-4	1:1600	1:819200	97	79
	G5-5	1:800	1:204800	72	40
15	G5-6	1:3200	1:204800	94	67
	<u>median</u>	<u>1:800</u>	<u>1:409600</u>	<u>90</u>	<u>62</u>
	Muc1(30A)-KLH +				
	QS21				
20	G4-1	1:800	1:409600	83	83
	G4-2	1:800	1:819200	92	58
	G4-3	1:800	1:204800	95	45
	G4-4	1:400	1:204800	81	20
	G4-5	1:1600	1:819200	93	57
25	G4-6	1:400	1:204800	85	48
	<u>median</u>	<u>1:800</u>	<u>1:307200</u>	<u>89</u>	<u>53</u>
	Muc1(50)-KLH +				
	QS21				
30	G6-1	1:3200	1:204800	73	40
	G6-2	1:3200	1:204800	89	52
	G6-3	1:3200	1:409600	98	79
	G6-4	1:3200	1:409600	86	57
	G6-5	1:1600	1:409600	97	72
35	G6-6	1:3200	1:409600	83	53
	<u>median</u>	<u>1:3200^c</u>	<u>1:409600</u>	<u>88</u>	<u>55</u>

^a All the MUC1 conjugates in this table were made by the MBS method. Mice immunized with 15 g MUC1-KLH /mouse or MUC1 peptide 15 g/mouse plus QS-21 10 g/mouse or BCG 3 x 10⁵/mouse were bled 7 days after the 3rd vaccines.

^b Test value obtained from pooled sera from all 6 mice in this group.

^c Compared with MUC1(30A)-KLH and MUC1(30)-KLH groups, p < 0.01 and p < 0.05 by Mann-Whitney/Wilcoxon non-parametric statistics.

^d Absorbance values of the sera from unprimed mice were used as background values for subtraction.

5 Comparison of conjugation methods (Table 3). The median IgG titer of sera from mice immunized with MUC1(20)-KLH conjugated using glutaraldehyde and MUC1(20)-KLH and MUC1(30A)-KLH conjugated using SPDP were 1:1350, 1:50 and 1:2700, respectively. The median IgG titer after
10 immunization with MUC1(20)-KLH and MUC1(30A)-KLH conjugated using MBS were 1:12150 and 1:12150 respectively, significantly higher than those prepared using glutaraldehyde or SPDP ($p < 0.01$). Likewise, the median % positive cells by flow cytometry with sera from mice
15 immunized with MUC1(20)-KLH (glutaraldehyde), MUC1(20)-KLH (SPDP) and MUC1(30A)-KLH (SPDP) were 59%, 32% and 61% respectively. Both the MUC1(20)-KLH (MBS) and MUC1(30A)-KLH (MBS) groups had 97% positive cells, significantly higher than those conjugates prepared by glutaraldehyde or SPDP ($p < 0.05$). For MUC1(20A) conjugates, on the other hand, no obvious difference in titer or % positive cell were observed between the MBS and SPDP methods. Reactivity against the MUC1-negative cell line 410.4 was minimal in all groups.

25 Comparison of different length MUC1 peptides (Table 3). Median IgG titers against the immunizing peptides were similar for sera from mice immunized with MUC1(20A)-KLH (1:4500 (SPDP) and 1:4500 (MBS)) and MUC1(30A)-KLH (1:2700 (SPDP) and 1:12150 (MBS)). Although the median % positive cells for MUC1(30A)-KLH (SPDP) (61%) was slightly but not significantly higher than for MUC1(20A)-KLH (SPDP) (32%), the median % positive cells for MUC1(30A)-KLH (MBS) (97%) was significantly higher than for MUC1(20A)-KLH (MBS) (54%). When MUC1(50)-KLH was compared with MUC1(30)-KLH and MUC1(20)-KLH (Tables 2 and 3), no significant difference in % positive cells was found.

Table 3. Serological Response with Antisera from Mice Immunized with MUC1 conjugated to KLH by Different Methods

		ELISA peptide (IgG)	Flow Cytometry (IgG)	
			410.4 cell	E4 cell
5	Mixed normal	blank	4	2
	mAb HMFG II	1:320	1	99
	Glutaraldehyde			
	MUC1 (20) -KLH			
10	1	4050	4	77
	2	1350	14	53
	3	1350	9	59
	median	<u>1350</u>	2	<u>59</u>
15	SPDP method			
	MUC1 (20A) -KLH			
	1	4050	4	4
	2	4050	14	32
	3	4050	10	91
	median	<u>4050</u>	<u>10</u>	<u>32</u>
20	MUC1 (20) -KLH			
	1	1350	5	96
	2	50	27	43
	3	50	7	16
	4	50	2	55
25	5	150	3	2
	6	50	11	21
	median	<u>50</u>	<u>6</u>	<u>32</u>
	MUC1 (30A) -KLH			
30	1	4050	11	85
	2	4050	10	96
	3	4050	4	56
	4	150	11	44
	5	450	2	30
	6	1350	3	65
35	median	<u>2700</u>	<u>7</u>	<u>61</u>
	MBS method			
	MUC (20A) -KLH			
	1	4050	11	61
	2	4050	6	54
40	3	12150	8	54
	median	<u>4050</u>	<u>8</u>	<u>54</u>
	MUC1 (20) -KLH			
	1	12150	6	89
	2	12150	14	99
45	3	12150	8	95
	4	36450	6	99
	5	109350	5	99
	6	12150	10	92
	median	<u>12150^b</u>	<u>7</u>	<u>97^b</u>
50	MUC1 (30A) -KLH			
	1	12150	8	95
	2	12150	6	99
	3	12150	12	86
	4	12150	3	98
55	5	12150	9	60
	6	36450	3	98
	median	<u>12150^b</u>	<u>7</u>	<u>97</u>

* Ten days after the 3rd immunization with 10 g MUC1-KLH/mouse plus QS-21 10 g/mouse. Number 1-3 of mice in each group are strain CB6F1 while number 4-6 are BALB/c.

^b Compared with the corresponding MUC1-KLH conjugated by SPDP or Glutaraldehyde method, using Mann-Whitney/Wilcoxon non-parametric statistics, $p < 0.01$ for ELISA titer, $p < 0.05$ for % positive cells.

Serological response to conjugated MUC1 with different sequences (Table 3). The median IgG titer against the immunizing peptides of sera from mice immunized with MUC1(20)-KLH (SPDP) (1:50) was obviously lower than that from mice immunized with MUC1(20A)-KLH (SPDP) (1:4050). However, the median % positive cells by flow cytometry with sera from these two groups was the same (32%). Both median IgG titer (1:12150) and % positive cells (97%) from mice immunized with MUC1(20)-KLH (MBS) were significantly higher than that for mice immunized with MUC1(20A)-KLH (MBS), 1:4050 and 54% respectively ($p < 0.05$). When MUC1(30)-KLH was compared with MUC1(30A)-KLH (Table 2), no obvious difference in serological response was found.

Effect of MUC1 immunization on T cell responses. All the mice in Tables 3 and 4 were tested for DTH. Forty eight hours after footpad injection with 5 μ g MUC1 peptide, the average footpad thickness for mice immunized with MUC1 peptides and MUC1-KLH constructs were 1.72 \pm 0.05 mm (n=12) and 1.73 \pm 0.06 mm (n=28) respectively and not different from 1.73 \pm 0.06 mm (n=20) of mice injected with PBS alone. After DTH testing with 5 g KLH (positive control), however, the average footpad thickness for mice immunized with MUC1-KLH was 2.1 \pm 0.17 mm (n=8), significantly increased above the KLH DTH response for unprimed mice and mice immunized with MUC1 peptides, 1.71 \pm 0.02 mm (n=6) and 1.71 \pm 0.03 mm (n=6) respectively.

The results of proliferative assays were similar to that of DTH assays. Spleen cells from 5 mice for each group immunized with MUC1(20)-KLH, MUC1(30)-KLH and MUC1(50)-KLH

or the corresponding peptide did not show increased lymphocyte proliferation above unprimed mice (4530cpm) when these cells were incubated with the corresponding peptide. Increased proliferation (14500-18600 cpm) was observed only when the spleen cells from mice immunized with MUC1-KLH conjugates were incubated with KLH.

An average of 30% specific release in 3 CTL assays on E4 cells (E:T, 60:1) was observed when the effector cells were obtained from BALB/c x C3H F1 mice immunized with mitomycin-treated E4 cells, but no significant specific release (0-2%) were seen from the mice immunized with MUC1 peptides or MUC1-KLH conjugates.

Effect of Active Immunization with MUC1-KLH on E4 cell Lung Metastasis in BALB/c x C3H Mice (Table 4). Ten mice immunized with MUC1(30)-KLH produced IgG antibody at a mean titer of 1:5940 with good E4 cell surface reactivity (mean % positive cells, 52%). Four weeks after i.v. challenge with E4 cells, the mean number of lung colonies from 10 mice was 19 and 20 for PBS and KLH control groups respectively, while only 1 for the MUC1(30A)-KLH group (p < 0.01).

Table 4. The Effect of Active Immunization with MUC1(30)-KLH Plus QS-21 on E4 Cell Lung Metastasis*

Sera or mAb	ELISA reciprocal titer	Flow Cytometry % positive cells (IgG)	No. of colonies in lungs
	(IgG)	410.4 cell	E4 cell
mAb HMFG-2	320	1	81
PBS Control			
1-1	-	-	44
1-2	-	-	51
1-3	-	-	6
1-4	-	-	1
1-5	-	-	5

- 21 -

	1-6	-	-	-	39
	1-7	-	-	-	2
	1-8	-	-	-	30
	1-9	-	-	-	3
5	1-10	-	-	-	4
	<u>mean^b</u>	<u>blank</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>19</u>
	KLH Control				
	2-1	-	-	-	51
	2-2	-	-	-	8
10	2-3	-	-	-	14
	2-4	-	-	-	5
	2-5	-	-	-	48
	2-6	-	-	-	17
	2-7	-	-	-	8
15	2-8	-	-	-	11
	2-9	-	-	-	23
	2-10	-	-	-	14
	<u>mean^b</u>	<u>0</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>20</u>
	MUC1(30A) -				
20	KLH				
	3-1	8100	5	50	4
	3-2	8100	5	62	5
	3-3	2700	6	21	3
	3-4	2700	4	84	1
25	3-5	2700	5	26	0
	3-6	2700	5	49	0
	3-7	8100	6	35	0
	3-8	8100	10	63	1
	3-9	8100	5	84	0
30	3-10	8100	6	41	0
	<u>mean</u>	<u>5940</u>	<u>6</u>	<u>52</u>	<u>1^c</u>

^a BALB/c x C3H F1 were immunized twice at one week interval with 8 g MUC1(30A)-KLH plus 8 g QS-21 /mouse and boosted one week after the 2nd vaccine with 8 g MUC1(30A) peptide plus 8 g QS-21. KLH group were given the same amount of KLH as the MUC1(30A)-KLH group. Three days after 2nd vaccine, 2×10^5 E4 cells were injected i.v. to all the groups. Twenty eight days after E4 cell injection, mice were sacrificed to check the metastatic colonies in lungs. Mice were bled 10 days after 2nd vaccine for ELISA and flow cytometry assay.

^b The test values of ELISA and flow cytometry were obtained from a pool of sera from 10 mice in this group.

^c Compared with PBS and KLH control groups, $p < 0.01$, by Mann-Whitney/Wilcoxon non-parametric statistics.

EXPERIMENTAL DISCUSSION

MUC1 specific antibodies have been detected in sera from occasional breast, pancreatic and colon cancer patients (2, 23). This suggests that MUC1 can be recognized by the human immune system, and raised the possibility that immunity against tumor cells expressing MUC1 might be induced by properly constructed MUC1 vaccines. Applicants' explored here vaccines containing synthetic MUC1 peptides of different lengths and sequences mixed with various adjuvants or covalently attached using different linker methods to KLH. Vaccines containing unconjugated MUC1 peptides plus QS-21 or BCG failed to induce antibody. However, when the MUC1 peptides were conjugated to KLH, plus QS-21, high titer IgM and, especially, IgG antibodies against MUC1 antigen were successfully induced. The reactivity of these antisera with MUC1-expressing mouse tumor E4 and human breast tumor MCF7 cells was strong, similar to mAb HMFG-2. When conjugation methods utilizing MBS, SPDP and glutaraldehyde were compared, MBS was found to be the best linker for preparing MUC1-KLH conjugates, inducing the most favorable antibody in both titer and specificity. Although conclusions on the effect of MUC1 peptide length on immune response can not be drawn at this time, 30 or 50 amino acid MUC1 conjugates seemed to induce antisera with higher titer against MUC1 positive tumor cells than 20 amino acid MUC1 conjugates. For MUC1 peptide with a single tandem repeat (20 amino acids), APDTR within the peptide, MUC1(20), induced antibody with stronger reactivity against MUC1-expressing E4 cells than MUC1(20A) which contains APDTR at the N-terminal of the peptide. This effect was lost, however, when longer peptides (30 amino acids) were tested.

T lymphocyte immunity against MUC1 peptide in unimmunized cancer patients has been documented (24, 25). In this study, applicants' tested T cell responses in mice

immunized with synthetic MUC1 peptides conjugated to KLH plus QS-21. QS-21 is an immunological adjuvant known to be capable of inducing CTL against other soluble protein antigens (29). However, applicants' did not observe T cell responses (DTH, lymphocyte proliferation or CTL) to MUC1 antigen or MUC1 positive cells after immunization. Others have attempted to induce T cell responses with synthetic MUC1 peptide, MUC1 conjugates, vaccinia expressing MUC1 or MUC1 expressed on whole tumor cells (5, 26-28). By immunizing mice with MUC1(20 amino acids) coupled to diphtheria-toxoid or fused with glutathione-S-transferase, or a natural mucin (human milk fat globule) plus complete Freund's adjuvant, Apostolopoulos et al (26) also failed to induce T cell responses in mice. However, T cell responses were observed after immunizing mice with whole tumor cells expressing MUC1 antigen, as applicants' were also able to demonstrate. DTH but not in vitro immune responses in mice immunized with MUC1(16 amino acids)-KLH were reported by Ding et al (27). These different observations may be due to the use of different strains of mice. While failing to induce T cell responses in mice with MUC1 peptide corresponding to one tandem repeat (20aa), Finn et al found MUC1 peptide corresponding to five tandem repeats has the capacity for CTL induction (30). Whether longer MUC1 peptides, conjugated to KLH or not, also have this capacity is the focus of further study. Since amino acid sequences of natural mucins and motifs of peptides associated with Class I MHC molecules are different in mice than humans (6, 31), T cell responses to MUC1 antigens in humans may be significantly different than those seen in mice. The CTL against MUC1 already identified in unimmunized patients with breast, ovary and pancreatic cancers suggest that this is so (24, 25).

Despite the lack of detected T cell immunity to MUC1 after immunization, protection from challenge with MUC1 positive E4 cells was seen. The number of lung metastases in mice

immunized with MUC(30)-KLH plus QS-21 was significantly lower than that for the PBS or KLH plus QS-21 control groups. This suggests that humoral immunity may be responsible for this resistance to challenge with MUC1-expressing E4 tumor cells. Others have also described protection from challenge with MUC1 positive tumor cells in rodents after immunization. Significant rejection of mucin-expressing tumor occurred in Fisher rats immunized with a vaccinia recombinant expressing MUC1 (5), and prolonged survival of CAF1 mice immunized with MUC1 conjugate BP-1-7-KLH (GVTSAPDTRPAPGSTA) (SQ ID. 1) was described after challenge with MUC1-expressing E3 cells (27). While DTH responses were seen in the BP-1-7-KLH immunized mice, CTL responses were not described. Consequently it is difficult to know from the results in rodent models which arm of the immune system is primarily responsible for protection from tumor challenge, and so it is difficult to predict which assays of immunity will be most important to follow in the clinic in Phase I/II trials designed for optimizing the immunogenicity of MUC1 vaccines.

CTL and antibody responses against MUC1 have been described in unimmunized patients with breast, ovary or pancreatic cancer (2, 23-25). It remains to be determined whether immunity against MUC1 in patients can be augmented by treatment with tumor vaccines. To date only one trial has been conducted, immunization of advanced disease breast cancer patients with a 105 amino acid MUC1 peptide (5 tandem repeats) mixed with BCG (30). While the final results are not available, it appears that neither anti MUC1 antibodies nor DTH were consistently augmented. There was, however, a 2-3 fold augmentation of HLA unrestricted anti- MUC1 CTL precursors in post-immunization blood compared to pre-immunization blood (O. J. Finn, personal communication). However, these results in patients with advanced disease may not be applicable to an adjuvant setting. Our results demonstrate that MUC1-KLH conjugates

are far more potent than MUC1 plus BCG for inducing IgM and IgG antibodies against MUC1. Although T cell responses to MUC1 antigen were not observed in our study, antibodies with high titer against synthetic MUC1 and MUC1-expressing murine and human tumor cells were successfully induced in all mice and this was associated with significant protection from challenge with MUC1-expressing E4 tumor cells. Based on this, applicants' have initiated a clinical trial with MUC1-KLH (30 amino acid) prepared using an MBS linker plus QS-21 and have plans to test a 90 amino acid MUC1 peptide in this setting as well. Assays for humoral, DTH, proliferative and CTL responses will be followed.

Human mucin MUC1 is abundantly expressed in many cancers of epithelial origin and is largely restricted to the apical surface of secretory cells in normal tissues. It is therefore a potential target for cancer immunotherapy. In preparation for clinical trials, vaccines containing synthetic MUC1 peptides of different lengths and sequences, and mixed with various adjuvants or covalently attached (using different linker methods) to protein carrier keyhole limpet hemocyanin (KLH) were studied in mice. MUC1 peptides (containing 20 or 30 amino acids) plus adjuvants QS-21 or BCG did not induce antibody. However, MUC1 peptides conjugated to KLH (MUC1-KLH), especially by linker m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), plus QS-21, induced high titer antibody against the immunizing peptides, median titer 1:800 for IgM and 1:307,200 for IgG. In addition, these antisera showed strong reactivity with MUC1-expressing mouse tumor E4 cells and human breast MCF-7 cells, similar to the MUC1-reactive mAb HMFG-2. Based on these studies, a vaccine containing MUC1-KLH conjugate prepared with linker MBS, plus QS-21, has been constructed for testing in clinical trials.

References

1. Arklie, J., Taylor-Paradimitriou, J., Bodmer, W., Egan, M., and Millis, R. Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers. *Int. J. Cancer*, 28:23-29, 1981.
2. Kotera Y., Fontenot, J. D., Pecher, G., Metzgar, R. S., and Finn, O. J. Human immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res.*, 54:2856-2860, 1994.
3. Devine, P. L., Layton, G. T., Clark, B. A., Birrell, G. W., Ward, B. G., Xing, P. X., and McKenzie, F.C. Production of MUC1 and MUC2 mucins by human tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178:593-599, 1991.
4. Hollingsworth, M. A., Strawhecker, J. M., Caffrey T. C., and Mack, D. R. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 57:198-203, 1994.
5. Hareuveni, M., Gautier, C., Kieny, M.-P., Wreschner, D., Chambon, P., and Lathe, R. Vaccination against tumor cells expressing breast cancer epithelial tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:9498-9502, 1990.
6. Gendler, S. J., Spicer, A. P., Lalani, E.-N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., and Taylor-Papadimitriou, J. Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:S42-S47, 1991.
7. Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S., and Duhig, T. A short sequence, within the

amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, 44:691-696, 1989.

- 5 8. Fontenot, J. D., Tjandra, N., Bu, D., Ho, C., Montelaro, R. C., and Finn, O.J. Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res.*, 53:5386-5394, 1993.
- 10 9. Perez, L., Hayes, D. F., Maimonis, P., Abe, M., O'Hara, C., and Kufe, D. W. Tumor selective reactivity of a monoclonal antibody prepared against a recombinant peptide derived from the DF3 human breast carcinoma-associated antigen. *Cancer Res.*, 52:2563-2568, 1992.
- 15 10. Taylor-Papadimitriou, J., Peterson, J. A., Arklie, J., Burchell, J., Ceriani, R. L., and Bodmer, W. F. Monoclonal antibodies to epithelium specific components of the milk fat globule membrane: production and reactions with cells in culture. *Int. J. Cancer*, 28:17-21, 1981.
- 20 11. Miller, F. R., Miller, B. E., and Heppner, G. H. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis*, 3:22-31, 1983.
- 25 12. Lalani, E.-N., Berdichevsky, F., Boshell, M., Shearer, M., Wilson D., Stauss, H., Gendler, S. J., and Taylor-Papadimitriou, J. Expression of the gene coding for a human mucin in mouse mammary tumor cells can affect their tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 266:15420-15426, 1991.
- 30 13. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1409-1416, 1973.
- 35

14. Maloy, W. L., Coligan, J.E., and Paterson, Y. Production of anti-peptide antisera. In Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 9.4.1-9.4.11. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.
15. Carleson, J., Drevin, H., and Axen, R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. Biochem. J., 173:727-737, 1978.
16. Kensil, C.R., Patel, U., Lennick, M., and Marciani, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria molina cortex. J. Immunol., 146:431-437, 1991.
17. Livingston, P.O., Ritter, G., and Calves, M.J. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2, and GD3 in the mouse. Cancer Immunol. Immunother., 29:179-184, 1989.
18. Zhang, S., Helling, F., Lloyd, K. O., and Livingston, P. O. Increased tumor cell reactivity and complement-dependent cytotoxicity with mixtures of monoclonal antibodies against different gangliosides. Cancer Immunol. Immunother., 40:88-94, 1995.
19. James S. P. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. In Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 7.10.1-7.10.10. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.
20. Luo, Y, and Dorf, M. E. Delayed-type hypersensitivity. In Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 4.5.1-4.5.5. John Wiley & Sons, Inc. New York,

1994.

21. Wunderlich, J. and Shearer, G. Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 3.11.1-3.11.15. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1994.
22. Dohi, T., Nores, G. A., Oguchi, H., Inufusa, H., and Hakomori, S. GD3 lactone as an immunogen associated with melanoma: effect of immunization with GM3 lactone on melanoma growth in vivo. In Gangliosides and Cancer (H. F. Oettgen, eds.) pp 275-281, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Germany) and VCH Publishers (New York, U.S.A.), 1988.
23. Rughetti A., Turchi V., Ghetti C. A., Scambia, G., Panici, P. B., Roncucci, G., Mancuso, S., Frati, L., and Nuti, M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. Cancer Res., 53:2457-2459, 1993.
24. Jerome, K. R., Barnd, D. L., Bendt, K. M., Boyer, C. M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I. F. C., Bast, R. C. Jr., and Finn, O. J. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. Cancer Res., 51:2908-2916, 1991.
25. Ioannides, C. G., Fisk, B., Jerome, K. R., Irimura, T., Wharton, J. T., and Finn, O. J. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. J. Immunol., 151:3693-3703, 1993.
26. Apostolopoulos, V., Xing, P-X., and McKenzie, F. C. Murine immune response to cells transfected with human

MUC1: immunization with cellular and synthetic antigens. Cancer Res., 54:5186-5193, 1994.

27. Ding, L., Lalani, E-N., Reddish, M., Koganty, R., Wong, T., Samuel, J., Yacyshyn, M. B., Meikle, A., Fung, P. Y. S., Taylor-Papadimitriou, J., and Longenecker, B. M. Immunogenicity of synthetic peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC1 mucin gene: effect of immunization on the growth of murine mammary adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. Cancer Immunol. Immunother., 36:9-17, 1993.
28. Bu, D., Domenech, N., Lewis, J., Taylor-Paradimitriou, J., and Finn, O. J. Recombinant vaccine mucin vector: in vitro analysis of expression of tumor-associated epitopes for antibody and human cytotoxic T-cell recognition. J. Immunol., 14:127-135, 1993.
29. Newmann, M. J., Wu, J-Y., Gardner B. H., Munroe, K. J., Leombruno, D., Recchia, J., Kensil, C.R., and Coughlin, R. T. A sponin adjuvant induction of ovalbumen-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses. J. Immunol., 148:2357-2360, 1992.
30. Finn, O. J. Immunity to epithelial tumors and mucin-based vaccine design. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 36:675, 1995.
31. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and Class II MHC molecules. Annu. Rev. Immunol., 12:181-207, 1994.

SECOND SERIES OF EXPERIMENTS

The mucin MUC-1 is expressed on breast carcinomas in an under glycosylated configuration and is therefore a target for immune recognition. A 30 amino acid (aa) sequence of MUC-1 has been synthesized and in order to augment its immunogenicity, has been covalently linked to KLH and mixed with the immune adjuvant QS21. Eligibility criteria include: patients with stage 4 NED (no evidence of disease), elevated CEA or CA15-3 levels and NED, or initially unresectable stage 3 post adjuvant therapy (tx). Five vaccines, each containing 100 mcg of MUC-1 peptide, were given on weeks 1, 2, 3, 7, 19. Thus far five pts are on study, although only 5 patients have received ≥ 3 vaccinations. Local erythema and induration at the injection site and mild flu-like symptoms most prominent after vaccination # 2 were observed in all pts. Patient sera were analyzed by ELISA for IgG and IgM antibodies against purified MUC-1 and by an immune adherence rosetting assay against MUC-1 positive or negative cell lines. IgM/IgG titers by ELISA for the first five patients were:

Week#	0	3	8	20
Pt#1	0/0	10240/40	2560/160	320/1280
Pt#2	0/0	180/640	2560/2560	
Pt#3	0/0	2560/320	2560/2560	
Pt#4	0/0	1280/80	2560/2560	
Pt#5	0/0	320/320	640/320	

For Pt# 1 to Pt# 4 immune adherence assays measuring IgM reactivity against MCF-7 cells gave a titer of 0 pre therapy which have risen to a titer of 160 by week 9. The fifth patient (Pt# 5) started with a titer of 80 pre therapy and increased to 160 by week 9. The MUC-1 mucin is strongly immunogenic in breast cancer patients when presented in a vaccine containing KLH and QS 21.

THIRD SERIES OF EXPERIMENTS

Stage IV no evidence of disease (NED) breast cancer patients (BCPts) or earlier stage BCPts except for rising CEA or BR2729 levels are at high risk for overt recurrence and might benefit from immunotherapy. Mucin MUC-1, found on most breast carcinomas, is a potential target. A synthetic 30 amino acid (aa) sequence of MUC-1 has been conjugated with KLH and mixed with the immune adjuvant QS-21 to increase immune recognition. Nine patients (ages 43-61) have been vaccinated: eight stage IV NED, one stage II with increased CEA level and NED, all but one stage IV NED patient on hormonal treatment. All patients received five doses of 100 mcg MUC-1 s.c. given on weeks 1, 2, 3, 7, and 19. All patients had transient grade 2 local toxicity at the vaccine site and most had grade 1-2 flu-like symptoms. All patients remain NED (median follow up 55 weeks) although one patient had a chest wall recurrence which was excised. For all patients, the range of IgM and IgG reciprocal titers against purified MUC-1 by ELISA are:

Week #	IgM Titers	IgG Titers
0	0-160	0-10
3	10-20,480	0-320
5	1280-20,480	40-20,480
13	10-20,480	160-2560
21	320-30,480	640-10,240

Five patients maintain IgG titers (range 320-1280) between six-twelve months following the last vaccine. Analysis of IgG subclass in eight patients reveal predominantly IgG1 and IgG3. Immune adherence rosetting against MCF-7 cell lines revealed an increase in IgM titers in 6/7 patients. Inhibition assays demonstrate that all sera react exclusively with the APDTRPA determinant of MUC-1. No evidence for augmentation of T cell immunity was found.

This MUC-1 vaccine is immunogenic in breast cancer patients who are NED.

FOURTH SERIES OF EXPERIMENTS

5

The mucin MUC-1 is expressed on breast cancers in an underglycosylated form compared to normal tissues and is therefore a potential target for cancer immunotherapy. MUC-1 contains multiple tandem repeats of the 20 amino acid peptide (VTSAPDTRPAPGSTAPPAGH). The APDTR epitope is particularly immunogenic since it is recognized by a variety of murine monoclonal antibodies and immune sera, and by some sera and cytotoxic T cells from unimmunized patients with epithelial cancers. A 30 amino acid peptide VTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPA was prepared with cysteine at the N-terminal end for chemical conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH). Six breast cancer patients immunized in the adjuvant setting with this conjugate plus the immunological adjuvant QS-21 have all produced high titer (by ELISA) IgG and IgM antibodies against the 30 amino acid MUC-1 peptide. A series of smaller peptides were prepared to determine the epitopes recognized by these immune sera in inhibition assays. Only peptides containing APDTRPA were able to inhibit ELISA reactivity for the full 30 amino acid peptide. No sera were inhibited by APDTR, APDTRP, PDTRPA or any other peptides that did not contain the full APDTRPA epitope. Remarkably, sera from all six patients recognized this same epitope and only this epitope. Reactivity was greatest, however, when the APDTRPA was at the C-terminal end of the peptide, raising the possibility that it is recognized preferentially because it was terminal in the immunogen as well. An additional group of patients are planned to be immunized with a conjugate vaccine containing MUC-1 peptide with other amino acids at the C-terminal end.

35

SEQUENCE LISTING

- (1) GENERAL INFORMATION:
- (i) APPLICANT: Livingston, Philip O
Zhang, Shengle
- (ii) TITLE OF INVENTION: Conjugated Mucin Peptide Vaccines
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 7
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- (A) ADDRESSEE: Cooper & Dunham LLP
(B) STREET: 1185 Avenue of the Americas
(C) CITY: New York
(D) STATE: NY
(E) COUNTRY: U.S.A.
(F) ZIP: 10036
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
- (A) NAME: White, John P
(B) REGISTRATION NUMBER: 28,678
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 50397-A-PCT/JFW/AKC
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
- (A) TELEPHONE: 212-278-0400
(B) TELEFAX: 212-391-0529
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 16 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Thr | Ser | Ala | Pro | Asp | Thr | Arg | Pro | Ala | Pro | Gly | Ser | Thr | Ala |
| 1 | | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | |
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

5

(11) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

15

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 1 5 10 15
 Gly Val Thr Ser Cys
 20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

25

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 21 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

35

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Ser Cys
 20

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

45

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 31 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

50

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

55

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 1 5 10 15
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Cys
 20 25 30

60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

15

Cys Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15
Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala
20 25 30

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

(A) LENGTH: 51 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Cys Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15
Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
20 25 30
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
35 40 45
Arg Pro Ala
50

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

50

(A) LENGTH: 20 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

60

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly
1 5 10 15

WO 97/34921

PCT/US97/04493

- 37 -

Val Thr Ser Ala
20

What is claimed is:

1. A vaccine capable of producing an immune response which recognizes a mucin, comprising an amount of
5 mucin peptide conjugated to an immunogenic protein effective to stimulate or enhance immune response in the subject, an effective amount of an adjuvant and a pharmaceutically acceptable vehicle.
- 10 2. The vaccine of claim 1, wherein the subject is a human.
3. The vaccine of claim 1, wherein the immunogenic protein is Keyhole Limpet Hemocyanin or a
15 derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin.
4. The vaccine of claim 1, wherein the mucin is MUC1.
- 20 5. The vaccine of claim 1, wherein the mucin is selected from a group consisting of MUC2, MUC3, MUC4 and MUC5.
6. The vaccine of claim 4, wherein the mucin peptide ranges from ten amino acids to three hundred amino
25 acids in length.
7. The vaccine of claim 4, wherein the mucin peptide is selected from the group consisting of
30 APDTRPAPGSTAPPAHGVTS, TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA, and (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₂VTSAPDTRPA.
8. The vaccine of claim 7, wherein the mucin peptide is VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA.
35
9. The vaccine of claim 6, wherein the effective

amount of conjugated mucin peptide is an amount between about 1 μ g and about 1mg.

- 5 10. The vaccine of claim 1, wherein the adjuvant is QS-21.
11. The vaccine of claim 10, wherein the effective amount of QS-21 is an amount between about 10 μ g and about 200 μ g.
- 10 12. The vaccine of claim 11, wherein the effective amount of QS-21 is about 100 μ g.
13. The vaccine of claim 1, wherein the subject is afflicted with cancer and the immune response produced in the subject upon administration of the vaccine effectively treats the cancer.
- 15 14. The vaccine of claim 1, wherein the subject is susceptible to cancer and the immune response produced in the subject upon administration of the vaccine effectively prevents the cancer.
- 20 15. The vaccine of claim 14, wherein cells of the cancer have the mucin on their surface.
- 25 16. The vaccine of claim 14, wherein the cancer is a breast cancer, prostate cancer, colon cancer, lung or pancreas cancer.
- 30 17. A method for stimulating or enhancing in a subject production of an immune response which recognizes the mucin comprising administering to the subject an effective dose of the vaccine of claim 1.
- 35 18. A method for treating cancer in a subject afflicted with cancer comprising administering to the subject

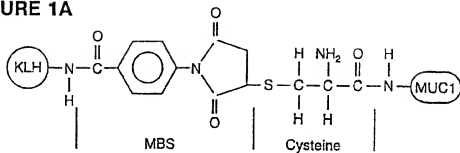
an effective dose of the vaccine of claim 1.

19. A method for preventing cancer in a subject susceptible to cancer comprising administering to the subject an effective dose of the vaccine of claim 1.
20. A method for preventing the recurrence of a cancer in a subject susceptible to cancer comprising administering to the subject an effective dose of the vaccine of claim 1.
21. The method of claim 17, 18, 19 or 20 wherein the immunogenic protein is Keyhole Limpet Hemocyanin or a derivative of Keyhole Limpet Hemocyanin.
22. The method of claim 17, 18, 19 or 20, wherein the adjuvant is QS-21.
23. The method of claim 17, 18, 19 or 20, wherein the mucin is MUC1.
24. The method of claim 17, 18, 19 or 20, wherein the mucin is selected from a group consisting of MUC2, MUC3, MUC4 and MUC5.
25. The method of claim 23, wherein the mucin peptide ranges from ten amino acids to three hundred amino acids in length.
26. The method of claim 25, wherein the mucin peptide is selected from the group consisting of APDTRPAPGSTAPPAHGVTS, TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA, and (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG)₂VTSAPDTRPA.

27. The method of claim 26, wherein the mucin peptide is VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA.
- 5 28. The method of claim 23, wherein the effective amount of conjugated mucin peptide is an amount between about 1 μ g and about 1mg.
29. The method of claim 25, wherein the adjuvant is QS-21.
- 10 30. The method of claim 29, wherein the effective amount of QS-21 is an amount between about 10 μ g and about 200 μ g.
- 15 31. The method of claim 30, wherein the effective amount of QS-21 is about 100 μ g.
32. The method of claim 18, 19 or 20, wherein cells of the cancer have the mucin on their surface.
- 20 33. The method of claim 18, 19 or 20, wherein the cancer is a breast cancer, prostate cancer, colon cancer, lung or pancreas cancer.

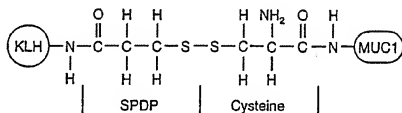
1/1

FIGURE 1A



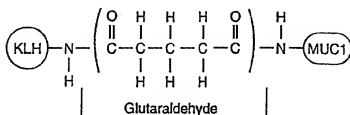
MBS Linker

FIGURE 1B



SPDP Linker

FIGURE 1C



Glutaraldehyde Linker

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US97/04493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C07K 7/04; A61K 38/17

US CL : 424/184.1, 185.1, 193.1; 514/2; 530/300, 324, 326

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/184.1, 185.1, 193.1; 514/2; 530/300, 324, 326

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 AFS, DIALOG, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

search terms: mucin, vaccine, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	DING er al. Immunogenecity of Synthetic Peptides Related to the Core Peptide Sequence Encoded by the Human MUC1 Mucin Gene: Effect of Immunization on the Growth of Murine Mammary Adenocarcinoma Cells Transfected with the Human MUC1 Gene. Cancer Immunolo. Immunother. 1993, Vol 36, pages 9-17, see entire document.	1, 3-4, 6, 9, 13-15, 17-19, 21, 23, 25, 28, 32 ----- 2, 5, 10-12, 16, 20, 22, 24, 29- 31, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

22 MAY 1997

Date of mailing of the international search report

21 JUL 1997

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

NANCY A. JOHNSON

Facsimile No. (703) 305-3230

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/04493

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	APOSTOLOPOULUS et al. Murine Immune Response to Cells Transfected with Human MUC1: Immunization with Cellular and Synthetic Antigens. Cancer Research. 01 October 1994, Vol. 54, pages 5186-5193, see entire document.	1,2,4,6,9,13- 20,23,25,28,32- 33 ----- 3,5,10-12,21- 22,24,29-31
Y	FINN. Immunity to Epithelial Tumors and Mucin-Based Vaccine Design. Proceedings of the American Association for Cancer Research. March 1995, Vol. 36, page 675, see entire document.	1-6, 9-25, 28-33
Y	HOLLINGSWORTH et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 MUCIN mRNAs in Human Pancreatic and Intestinal Tumor Cell Lines. Int. J. Cancer. 1994, Vol. 57, pages 198-203, see entire document.	5, 24
Y	US 5,455,034 A (NAGARAJA and CHENGAPPA) 03 October 1995, column 14, lines 26-32.	10-12, 22, 29-31
X ----- Y	US 5,229,289 A (KJELDSSEN et al.) 20 July 1993, see entire document.	1-2, 9, 13-20, 32, 33 ----- 3-6, 10-12, 21- 25, 28-31